



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

MENCIÓN SALUD ANIMAL

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA
MEDIANTE INMUNOHISTOQUIMICA EN ABORTOS BOVINOS DE
LA CUENCA LECHERA SANTAFESINA Y COMPARACIÓN CON
LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON EL AISLAMIENTO VIRAL Y
LA INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

AUTORA: M.V. MARIA DEL ROCIO MARINI

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIAS VETERINARIAS

Esperanza, 29 de abril de 2008



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCIÓN SALUD ANIMAL

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA
MEDIANTE INMUNOHISTOQUIMICA EN ABORTOS BOVINOS DE
LA CUENCA LECHERA SANTAFESINA Y COMPARACIÓN CON
LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON EL AISLAMIENTO VIRAL Y
LA INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

AUTORA: M.V.. MARIA DEL ROCIO MARINI

DIRECTORA: M.V. M.Sc. ANA MARÍA CANAL

JURADO:

DR. EDUARDO J. GIMENO

DR. HUGO H. ORTEGA

DR. JAVIER LÉRTORA

Esperanza, 29 de abril de 2008

DEDICATORIA

Con amor y gratitud:

A mi madre, que me ayuda a no bajar los brazos y logra que siempre salga el sol en mi horizonte;

A mi padre, que me enseña la ternura y el valor de pertenecer a una familia;

A mis hijos, que son mi fuerza interior y me hacen sentir la persona más querida;

A mis hermanos y sobrinos, que me alegran la vida.

AGRADECIMIENTOS

Con especial cariño a:

Dra. Ana María Canal, por ser mi directora de tesis, por brindarme su amistad y apoyo incondicional, y por haber confiado siempre en mí.

Dr. Roberto Rodríguez, por darme la posibilidad de trabajar y dar clases con él, y por su valioso aporte al realizar las necropsias y la toma de muestras de los fetos utilizados en la presente tesis.

Profesora Adela Gollán, por el valioso aporte en la realización de las técnicas de aislamiento viral e IFD de los fetos de la presente investigación, por facilitarme las cepas virales de referencia para realizar los controles positivos y el western blot, por su continuo apoyo y disposición para corregir manuscritos, y por su amistad, que es muy valiosa para mí.

Dr. Hugo Ortega, por su asesoramiento y apoyo continuo en el presente trabajo de investigación.

Dr. Eduardo Baroni, por su confianza en mí.

Dr. Carlos Peralta, por iniciarme en el apasionante estudio de la Patología.

Dr. Héctor Tarabla, por su ayuda en la presentación de los resultados de la presente tesis

Dr. Rafael Althaus, por su apoyo y ayuda en la realización del análisis estadístico, y por la corrección de manuscritos.

Dr. Javier Lértora, por facilitarme cortes histológicos de piel de bovinos PI para usar como controles positivos.

Dr. José Luis Otero, por sus sugerencias y correcciones en la redacción de esta Tesis.

Todos mis compañeros y amigos de las cátedras de Patología Básica y Biología Celular, que me ayudaron con la toma de muestras y el procesamiento del material, me apoyaron en todo momento, me reemplazaron en muchas de las actividades docentes y me brindaron todas las facilidades para realizar la presente Tesis.

Todos los investigadores, pasantes y docentes del laboratorio de Biología Celular y Molecular, por su constante ayuda en la realización de las técnicas de IHQ y Western blot.

Todos los alumnos que durante las guardias en el Hospital de Salud Animal realizaron las necropsias y la toma de muestras junto con el Dr. Roberto Rodríguez.

Las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por brindarme la posibilidad de realizar esta Tesis de Maestría.

La Universidad Nacional del Litoral, por facilitarme la Beca para realizar este estudio de posgrado.

Todos los Médicos Veterinarios que colaboraron remitiendo los fetos abortados al Hospital de Salud Animal.

Toda mi familia, que ayudó en todo momento para que pudiera realizar y redactar la presente Tesis, colaborando conmigo material y espiritualmente.

Todos aquellos que no he nombrado y que contribuyeron directa o indirectamente en la realización de este trabajo.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	I
INDICE DE TABLAS.....	IV
INDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	X
SUMMARY.....	XI
I- INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Aspectos generales.....	1
I.2. Hipótesis.....	5
I.3. Objetivos.....	6
I.3.1. General.....	6
I.3.2. Específicos.....	6
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
II.1. Reseña histórica.....	7
II.2. Agente etiológico (no me gusta el título).....	12
II.2.1. Taxonomía	12
II.2.1.1. Características generales de la familia Flaviviridae.....	12
II.2.1.2. Características generales del género Pestivirus.....	14
II.2.2. Estructura del virus de la Diarrea Viral Bovina.....	15

II.2.2.1. Genoma	15
II.2.2.2. Proteínas virales: estructurales y no estructurales.....	17
II.2.3. Variabilidad.....	22
II.2.4. Clasificación.....	24
II.2.4.1. Genotipos.....	25
II.2.4.2. Biotipos.....	27
II.3. Epidemiología.....	29
II.3.1. Fuentes de infección	29
II.3.2. Modos de transmisión.....	30
II.4: Patogenia.....	32
II.4.1. Ingreso del virus a la célula.....	32
II.4.2. Replicación viral.....	33
II.4.3. Ensamblaje y liberación de partículas virales.....	34
II.4.4. Cuadros clínicos producidos por el virus DVB.....	35
II.4.4.1. Infecciones post-natales en bovinos susceptibles, inmunocompetentes y no preñados.....	36
II.4.4.2. Infecciones transplacentarias.....	41
II.4.4.3. Enfermedad de las mucosas.....	44
II.5. Lesiones producidas por la infección con el DVB.....	46
II.5.1. Lesiones macroscópicas.....	46
II.5.2. Lesiones microscópicas.....	50
II.5.3. Lesiones macro y microscópicas en fetos.....	55
II.6. Diagnóstico.....	56

II.6.1. Detección del virus por Aislamiento viral.....	57
II.6.2. Detección del ácido nucleico viral.....	59
II.6.3. Detección de antígenos virales.....	61
II.6.3.1. Detección de antígenos mediante el Método de Elisa de Captura de Antígenos.....	61
II.6.3.2. Detección de antígenos mediante Inmunohistoquímica.	62
II.6.4. Detección de respuesta inmune contra el vDVB.....	66
II.6.4.1. Seroneutralización viral.....	68
II.6.4.2. Enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA indirecto).....	68
II.6.4.3. Otras pruebas serológicas.....	69
 III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	 71
III.1. Materiales.....	71
III.2. Métodos.....	71
III.2.1. Aislamiento viral.....	71
III.2.2. Histopatología e Inmunohistoquímica.....	73
III.2.2.1. Análisis histopatológico.....	74
III.2.2.2. Recuperación antigénica.....	75
III.2.2.3. Inmunohistoquímica.....	77
III.2.3. Western blot	80
III.2.3.1 Procesamiento de las muestras utilizadas para western Blot.....	80
III.2.3.2. Técnica de western blot.....	81
III.2.4. Concordancia entre técnicas diagnósticas utilizadas.....	84

IV. RESULTADOS.....	85
IV.1. Aislamiento viral e Inmunofluorescencia Directa.....	85
IV.2. Lesiones histopatológicas en órganos de los 50 fetos abortados y comparación entre los fetos con y sin aislamiento viral.....	86
IV.2.1. Lesiones histopatológicas en órganos de los 50 fetos abortados	86
IV.2.2. Comparación de lesiones en órganos de fetos con y sin aislamiento de vDVB.....	91
IV.2.2.1. Distribución de frecuencias de lesiones observadas.....	91
IV.2.2.2. Análisis estadístico.....	94
IV.3. Recuperación antigénica.....	97
IV.4. Inmunohistoquímica en órganos de fetos abortados para la identificación de antígenos del virus de la Diarrea Viral Bovina.....	99
IV.5. Técnica de western blot para medir la especificidad del anticuerpo.....	104
IV.6. Comparación de resultados obtenidos con las técnicas de aislamiento viral, IFD e IHQ.....	106
IV.6.1. Distribución de frecuencias de resultados obtenidos.....	106
IV.6.2. Análisis estadístico.....	107
V. DISCUSIÓN.....	112
V.1. Lesiones histopatológicas en órganos de los 50 fetos abortados y comparación entre los fetos con y sin aislamiento viral.....	112
V.2. Recuperación Antigénica.....	119

V.3. Inmunohistoquímica en órganos de fetos abortados para la identificación. de antígenos del virus de la Diarrea Viral Bovina.....	126
V.4. Comparación de resultados obtenidos con las técnicas de aislamiento viral, IFD e IHQ.....	129
VI. CONCLUSIONES.....	132
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134

VII- ANEXOS

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABAC	Banco Argentino de células
ac	anticuerpo
AEC	aminoetilcarbazol
ala	alanina
asp	asparagina
ARN	Acido Ribonucleico
BDv	Virus de la Enfermedad de la frontera
BSA	Albúmina sérica bovina
cys	cisteína
CP	citopatogénico
CSFv	Virus de la Peste porcina Clásica
DVB	Diarrea Viral Bovina
ECP	Efecto citopatogénico
EM	Enfermedad de las Mucosas
GDD	Gly-Asp-Asp
gp	glicoproteína
H.E.	Hematoxilina y Eosina
H ₂ O ₂	Agua oxigenada
IBR	Rinotraqueítis Infecciosa Bovina
IF	Inmunofluorescencia
IFD	Inmunofluorescencia Directa
IHQ	Inmunohistoquímica

kDa	kilodalton
LDL	Lipoproteína de baja densidad
lys	lisina
mA	miliamperes
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MC	Medio de crecimiento
MEM	Medio mínimo esencial (Minimun essential medium)
MM	Medio de mantenimiento
NCP	No citopatogénico
nm	nanómetros
NT	Neutralización
ORF	Marco de apertura de lectura (open reading frame)
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Persistentemente infectados
PI ₃	Parainfluenza 3
PM	Peso molecular
RIPA	Buffer de lisis (RadioinmunoPrecipitation Assay)
RT-PCR	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
ser	serina
SFB	Suero Fetal Bovino
UTR	Región no codificante (untranslated region)
vDVB	Virus de la Diarrea Viral Bovina
vDVB1	Virus de la Diarrea Viral Bovina Genotipo I

vDVB2	Virus de la Diarrea Viral Bovina Genotipo II
W	watts
μ l	microlitro
μ m	micrómetro
TBS-T	Tris base (Buffer de Western blot) + Tween

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	vDVB, biotipos y enfermedad. Modificado de Deregt y Loewen, 1995.....	28
Tabla 2	Tratamientos de recuperación antigénica realizados, combinados con las diluciones de anticuerpo primario utilizadas.....	76
Tabla 3	Estándares de PM para SDS-PAGE, amplio espectro. BIO-RAD.....	82
Tabla 4	Resultados de las técnicas de Aislamiento Viral e IFD en 50 fetos abortados.....	85
Tabla 5	Frecuencia y grados de presentación de lesiones microscópicas en órganos de 50 fetos abortados	86
Tabla 6	Frecuencias y grados de presentación de lesiones en órganos de fetos con y sin aislamiento de vDVB.....	91
Tabla 7	Valores de Chi-cuadrado y p para lesiones histopatológicas que presentan relación significativa con el aislamiento viral.....	95
Tabla 8	Aislamiento vs. Necrosis linfoidea en Ganglio linfático.....	95
Tabla 9	Aislamiento vs. Necrosis del epitelio de la mucosa en la válvula ileocecal.....	96
Tabla 10	Aislamiento vs. Depleción y necrosis linfoidea en la válvula ileocecal.....	96
Tabla 11	Resultados obtenidos con los diferentes tratamientos de recuperación antigénica aplicados en 10 cortes de tejidos.....	97

Tabla 12	Immunorreactividad para el Genotipo I del vDVB en diferentes órganos de fetos bovinos positivos a IHQ.....	99
Tabla 13	Resultados obtenidos con aislamiento viral (AV), inmunofluorescencia directa (IFD) e inmunohistoquímica (IHQ) en 50 fetos abortados.....	106
Tabla 14	Comparación de resultados obtenidos por IHQ para la identificación del vDVB en los 50 fetos abortados con los obtenidos con el aislamiento viral y la IFD.....	107
Tabla 15	Valores de Chi cuadrado y valores de p para comparar las técnicas diagnósticas utilizadas en 50 fetos abortados.....	108
Tabla 16	Tabla de 2x2: Aislamiento vs. IFD	109
Tabla 17	Tabla de 2x2: Aislamiento vs. IHQ.....	110
Tabla 18	Tabla de 2x2: IFD vs.IHQ.....	111

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema del genoma del vDVB, que ilustra el orden de codificación de las proteínas virales.....	16
Figura 2	Hígado feto nº 11. H.E. Vacuolización marcada de hepatocitos. Aislamiento negativo (10X)	89
Figura 3	Corazón feto nº 38. H.E. Infiltrados mononucleares en epicardio. Aislamiento positivo (40x).....	89
Figura 4	Riñón feto nº 14. H.E. Infiltrados mononucleares focales. Autólisis leve. Aislamiento positivo (4x).....	89
Figura 5	Riñón feto nº 14. H.E. Infiltrados mononucleares intersticiales. Aislamiento positivo (10x).....	89
Figura 6	Válvula ileocecal feto nº 1. H.E. Se observa acortamiento de vellosidades y placas de Peyer con depleción linfoidea. Aislamiento positivo (4X).....	89
Figura 7	Válvula ileocecal feto nº 38. H.E. Depleción linfoide en placas de Peyer. Aislamiento positivo (10x).....	89
Figura 8	Válvula ileocecal feto nº 1. H.E. Vasculitis en submucosa. Aislamiento positivo (40x).....	90
Figura 9	Timo feto nº 38. H.E. Depleción linfoidea. Aislamiento positivo (4x).....	90
Figura 10	Timo feto nº 38. Se observa depleción y necrosis linfoidea. Aislamiento positivo (10x).	90

Figura 11	Timo feto nº 1. H.E. Se aprecia depleción y necrosis linfoidea. Aislamiento positivo (10x).....	90
Figura 12	Bazo feto nº 18 .H.E. Depleción linfoidea en pulpa blanca. Aislamiento positivo (10x).....	90
Figura 13	Bazo feto nº 20. H.E. Depleción linfoidea. Se observan células hematopoyéticas. Aislamiento negativo (10x).....	90
Figura 14	Ganglio linfático feto nº 36. H.E. Hiperplasia linfoidea en corteza. Aislamiento negativo (4X).....	91
Figura 15	Cerebro feto nº 38. H.E. Manguitos perivasculares. Aislamiento positivo (10x).	91
Figura 16	IHQ en piel de ternero PI, control positivo. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en las células del folículo piloso con el ac. monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (40X).....	101
Figura 17	IHQ en pulmón de ternero PI, control positivo. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en células del tejido interlobulillar con el ac. monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (10x).....	101
Figura 18	IHQ en pulmón de ternero PI, control positivo. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en células del tejido interlobulillar con ac. monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (10x).	102
Figura 19	IHQ en corazón feto nº 33 Inmunomarcación intracitoplasmática en células del tejido conjuntivo y del sistema de conducción. Ac. monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (10x).....	102

Figura 20	IHQ en corazón de feto n° 38. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en cardiomiocitos. Ac. monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (10x).....	102
Figura 21	IHQ en corazón feto n° 38. Inmunomarcación intracitoplasmática color rojo en células del sistema de conducción Ac. monoclonal 157 Contraste con Hematoxilina (10x).....	102
Figura 22	IHQ en timo, feto n° 11. Inmunomarcación intracitoplasmática color rojo en células del parénquima y del intersticio. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (40x).....	103
Figura 23	IHQ en válvula ileocecal del feto n° 28. Inmunomarcación intracitoplasmática en células epiteliales glandulares y del corion de la válvula ileocecal. Ac. Monoclonal 157 (10x).....	103
Figura 24	IHQ en válvula ileocecal del feto n° 28. Inmunomarcación intracitoplasmática en células epiteliales glandulares y linfocitos de las placas de Peyer. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (40X).....	103
Figura 25	IHQ en piel del feto n° 7. Inmunomarcación intracitoplasmática color rojo en células de la dermis. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (40X).....	103
Figura 26	IHQ en piel de feto n° 7. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en células del músculo liso de los vasos sanguíneos de la dermis. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (40X).....	104

Figura 27	IHQ en riñón feto n° 17. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en células intersticiales. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (40x).....	104
Figura 28	IHQ en ganglio linfático, región medular, feto n° 12. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en linfocitos. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (10x).....	104
Figura 29	IHQ en ganglio linfático, región medular. Feto n° 40. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en célula de la pared de un vaso sanguíneo. Contraste con Hematoxilina. 40X.....	104
Figura 30	Resultados del western blot utilizando el anticuerpo 157 para vDVB genotipo I. Dilución 1:50.....	105
Figura 31	Gráfico comparativo entre Aislamiento e IFD.....	109
Figura 32	Gráfico comparativo entre Aislamiento e IHQ.....	110
Figura 33	Gráfico comparativo entre IFD e IHQ.....	111

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue identificar mediante inmunohistoquímica antígenos del vDVB en órganos de 50 fetos abortados fijados en formol y comparar los resultados con los obtenidos con el Aislamiento viral y la Inmunofluorescencia directa. El material fue remitido al Hospital de Salud Animal desde distintas localidades de la Cuenca lechera Santafesina, donde se tomaron muestras de distintos órganos. Se compararon las lesiones observadas en los tejidos analizados en fetos con y sin aislamiento del virus y se realizaron distintas técnicas de recuperación antigénica previo a la técnica de IHQ. Se utilizaron anticuerpos monoclonales diferentes para identificar cada genotipo del vDVB (157 para el genotipo I y BA-29 para el genotipo II). Por último, se compararon los resultados obtenidos entre las distintas técnicas diagnósticas utilizadas, tomando al aislamiento viral como técnica de referencia. Encontramos relación estadísticamente significativa entre el aislamiento viral y las lesiones de necrosis linfoidea en ganglios linfáticos, necrosis del epitelio de la mucosa de la válvula ileocecal y necrosis linfoidea en placas de Peyer. La recuperación antigénica que brindó mejores resultados fue la realizada con proteinasa K. Fueron detectados antígenos del genotipo I del virus, no se revelaron antígenos del genotipo II. Los valores de Chi-cuadrado y p indican relación estadística significativa entre los resultados del aislamiento viral con la IFD y la IHQ, y el índice kappa muestra una concordancia moderada entre aislamiento e IFD, y leve entre aislamiento e IHQ.

Palabras Clave: vDVB, fetos, abortos, lesiones, aislamiento viral, Inmunofluorescencia directa, Inmunohistoquímica

SUMMARY

The purpose of the present thesis was to identify through immunohistochemistry antigens of bovine viral diarrhoea virus in formalin fixed tissues of bovine aborted fetuses, and to compare the results with virus isolation and direct immunofluorescence. Samples were submitted to Animal Health Hospital from different farms located in the so called “Cuenca Lechera Santafesina”, being taken from different organs. The observed lesions in analyzed tissues were compared to fetuses with and without virus isolation, and different methods of antigenic retrieval were achieved before immunohistochemistry.

Different monoclonal antibodies were used to identify each BVDv genotypes (157 for genotype I and BA-29 for genotype II). Finally, the results obtained from different methods were compared, using virus isolation as the gold standard technique. We found a significant ratio between virus isolation and the lesions of lymphatic necrosis from lymph nodes, necrosis of mucosal epithelium and lymphatic tissues of Peyer’s patches. Proteinase K treatment showed the best results in antigenic retrieval. BVDv genotype I antigens were detected, nevertheless any antigens of genotype II was found. The Chi-square value and the p value indicated a significant ratio between the results of viral isolation and direct immunofluorescence and immunohistochemistry. The kappa value showed a good concordance into viral isolation and IFD, and a moderate concordance into viral isolation and immunohistochemistry

Key words: BVDv, fetuses, abortions, lesions, viral isolation, Direct immunofluorescence, Immunohistochemistry.

1- INTRODUCCIÓN

I- INTRODUCCIÓN

I.1. Aspectos Generales

El virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) tiene distribución mundial, es un importante patógeno del bovino y se transmite con facilidad entre los integrantes de las especies receptoras. El nombre del virus es desafortunado, porque hay manifestaciones múltiples y diversas que se desarrollan en el ganado infectado con este agente, incluyendo infecciones subclínicas, diarrea, inmunosupresión, problemas de repetición de celos, abortos, momificaciones, defectos congénitos, inmunotolerancia e infecciones persistentes, además de los cuadros de enfermedad de las mucosas aguda y crónica (Baker, 1987; Radostits y Littlejohns, 1988; Brownlie, 1990a; Houe, 1995; Bielefeldt Ohmann, 1995).

Principalmente, afecta la salud reproductiva del rodeo, y origina grandes pérdidas económicas debido a las variadas formas de la infección por vDVB, que incluyen reducción de la producción de leche, reducción de la tasa de concepción, desórdenes respiratorios, otras enfermedades, muertes entre los animales que tienen infección aguda, abortos, defectos congénitos y retardo en el crecimiento después de la infección fetal. Además, la infección fetal puede dar terneros infectados persistentes los cuales frecuentemente son débiles y de bajo peso, lo que incrementa la susceptibilidad a otras enfermedades, y pueden eventualmente morir de enfermedad de las mucosas (Radostits y Littlejohns, 1988; Houe, 1995; Houe, 1999; Muñoz-Zanzi *et. al.*, 2004).

En la actualidad, también hay que considerar los cuadros producidos por el genotipo II del vDVB, que causa los cuadros de enfermedad aguda severa y los síndromes hemorrágicos y trombocitopénicos, la mayoría de alta mortalidad.

La patogenia de las infecciones por vDVB muestra rasgos característicos no vistos en otras enfermedades. Las consecuencias de las infecciones fetales, considerando sobre todo la generación de animales persistentemente infectados, que pueden tener una larga vida y que en algún momento pueden desarrollar la enfermedad de las mucosas son exclusivas de esta enfermedad (Cutlip *et al.*, 1980; Brownlie *et al.*, 1984; Dufell y Harkness, 1985; Baker, 1987).

La infección por este virus es endémica en la mayoría de las poblaciones de bovinos, con prevalencias de anticuerpos séricos que varían desde 50 a 90%. Las prevalencias de bovinos persistentemente infectados varía entre 0,5 y 2% (Baker, 1987; Bolin y Mc Clurkin, 1985; Houe, 1999). Evermann *et al.* (1993) informaron que de 114 aislamientos virales realizados en un período de 4 años, el 8% estuvo asociado con abortos.

Bolin y Ridpath (1998), realizaron un estudio de prevalencia de contaminación de suero fetal bovino con el vDVB, o con anticuerpos neutralizantes contra el virus. Identificaron el virus en el 23% de las muestras (en el 51% el genotipo I, en el 29% el genotipo II, y el 10% ambos genotipos) y anticuerpos en el 11%. Rossi *et al.* (1980) también encontraron vDVB en sueros fetales y en cultivos celulares bovinos de pulmón. Estos y otros estudios realizados sobre muestras fetales (Murray, 1991; Thür *et al.*,

1998; Fredriksen *et al.*, 1999 a y b; Yapkic *et al.*, 2006) evidencian la infección del feto con vDVB.

Kobrak y Weber (1997), informan que la situación en la Argentina es similar al resto del mundo, con 70% de seroprevalencia y una prevalencia de bovinos persistentemente infectados del 1%. Odeón *et al.* (2001) encontraron seroprevalencias en bovinos adultos de 90,7% en el sudeste de la provincia de Buenos Aires y 48,6% en los llanos de La Rioja. El porcentaje de bovinos seropositivos de 6 a 12 meses de edad fue de 41,9%, 25,6% y 45,6% para 11 distritos del sudeste de la provincia de Buenos Aires, 7 del sur de Corrientes, y 9 de los llanos de La Rioja, respectivamente.

En la región de la cuenca lechera santafesina, ubicada en la pampa húmeda, zona de intensa actividad agrícola-ganadera, la enfermedad se halla ampliamente difundida. (Gollán *et al.*, 2006). Así lo demuestran trabajos previos de prevalencia de anticuerpos en sueros de fetos bovinos (Pinto *et al.*, 1993; Muñoz *et al.*, 1996) y en pool de leche de tambos de la cuenca lechera santafesina (Occhi *et al.*, 1991). Moore *et al.* (2003) encontraron anticuerpos contra el genotipo 1 del vDVB en el 45 % de 95 muestras de fluidos fetales procesadas provenientes de rodeos de carne y leche de la Pampa húmeda Argentina.

Si bien los anticuerpos vacunales pueden interferir en los resultados de la seroprevalencia, la enfermedad está presente en nuestro país, en forma endémica en algunas regiones, y un porcentaje importante de bovinos jóvenes está siendo expuesto al virus (Lértora, 2003).

Muñoz *et al.* (1996) encontraron en Argentina elevada prevalencia de infección en los fetos, a través del aislamiento viral en cultivos celulares primarios a partir de órganos fetales; aunque estudios previos realizados en el país han demostrado que no se determina la etiología del aborto en el 50 al 60% de los fetos bovinos enviados al laboratorio (Campero *et al.*, 1994).

Zábal *et al.* (2000), encontraron el vDVB en muchos lotes comerciales de sueros fetales bovinos, a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, que permite evidenciar el biotipo no citopático, que es el aislado mas frecuentemente.

No existen signos clínicos patognomónicos de la infección por vDVB en bovinos. Las investigaciones diagnósticas por lo tanto dependen del laboratorio para la detección del virus, sus componentes o los anticuerpos inducidos por el virus en las muestras obtenidas (Sandvik, 1999).

La inmunohistoquímica se ha transformado en los últimos años en una herramienta esencial en patología. Se realiza rutinariamente en tejido fijado en formalina y embebido en parafina, aventaja a otras técnicas en términos de conveniencia a la remisión de muestras, posibilita el estudio retrospectivo de muestras enviadas para examen histopatológico y permite una precisa asociación entre el antígeno viral con tipos celulares y lesiones histológicas (Dubovi, 1996).

Para el reconocimiento morfológico de los antígenos de vDVB localizados en el citoplasma de las células infectadas, el examen inmunohistoquímico (IHQ) de secciones de tejido provee un diagnóstico más específico que la detección de antígenos extraídos en una solución (Sandvik, 1999).

Según Ellis *et al.* (1995), la IHQ de tejidos fijados en formalina es el método diagnóstico más conveniente en fetos. Hay un significativo número de resultados falsos positivos y falsos negativos con la inmunofluorescencia (sensibilidad: 77%, especificidad: 83%), y significativo número de falsos negativos con el aislamiento viral (sensibilidad: 83%, especificidad: 100%), mientras que la IHQ presenta el mejor desempeño: sensibilidad: 97%, especificidad: 97%. En casos de fetos con avanzada autólisis, la IHQ de cerebro fijado en formalina se recomienda sobre el aislamiento viral y la detección del anticuerpo por ELISA (Thür *et al.*, 1997). Por su parte, Khodakaram-Tafti y Miller (2006) establecieron que la IHQ puede ser usada sobre intestino con avanzado estado de autólisis.

Las muestras fijadas en formalina son más estables que las muestras de sangre o suero, evitándose así falsos negativos por autólisis o putrefacción, y los anticuerpos calostrales no interfieren con la técnica, permitiendo analizar terneros neonatos (Haines *et al.*, 1992)

1.2. Hipótesis

La técnica de IHQ puede ser utilizada para el diagnóstico del aborto provocado por efecto de la infección del virus de la Diarrea Viral Bovina a partir de órganos fetales fijados en formol y embebidos en parafina, aún en avanzado grado de autólisis de los tejidos.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Aplicar la Inmunohistoquímica para la identificación del virus de la Diarrea Viral Bovina en órganos de fetos abortados y comparar los resultados con el aislamiento viral y la IFD.

1.3.2. Específicos

a) Describir lesiones microscópicas en órganos de fetos abortados, determinar su frecuencia de distribución y comparar las lesiones presentes en fetos con y sin aislamiento del virus de la Diarrea Viral Bovina.

b) Identificar el método de recuperación de antígenos de virus de la Diarrea Viral Bovina que resulte más eficaz en tejidos fetales fijados en formalina y embebidos en parafina.

c) Identificar mediante inmunohistoquímica antígenos del virus de la Diarrea Viral Bovina en órganos de fetos abortados de la Cuenca lechera Santafesina.

d) Establecer la concordancia entre los resultados obtenidos con la inmunohistoquímica, el aislamiento viral y la inmunofluorescencia directa.

II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

II.1. Reseña histórica

En 1946 Childs describe una enfermedad que afectó bovinos en la provincia de Saskatchewan, en el oeste de Canadá, en base a la sintomatología y la patología macroscópica, de origen desconocido, a la que llamó la X enfermedad, en dos formas clínicas: aguda y subaguda. Los tejidos epiteliales con células escamosas o cuboidales eran los primeros afectados, y más tarde otros tejidos.

El mismo año, Olafson *et al.* (1946) en Estados Unidos describen un brote de una enfermedad transmisible, similar a la descrita en el oeste de Canadá, caracterizada por diarrea severa, depresión, anorexia y ulceración de la mucosa oral. Esta nueva afección estaba asociada con signos respiratorios, leucopenia, disminución en la producción láctea, incremento en la tasa de abortos, y era reproducible por inoculación de sangre y extractos de bazo de animales enfermos. Como no fueron halladas bacterias en el inóculo, se asumió que el agente infeccioso era viral. Esta enfermedad reproducible, con signos y lesiones variables en cuanto a severidad, comenzó a llamarse Diarrea viral de los bovinos.

En 1953, Ramsey y Chivers describieron una enfermedad que creyeron diferente a la Diarrea Viral, porque era más esporádica y más difícil de reproducir, ya que los animales inoculados con sangre o extractos de órganos de animales enfermos sólo desarrollaban una pirexia transitoria. La enfermedad recibió el nombre de Enfermedad de las Mucosas, a raíz de las erosiones y úlceras observadas en el tracto digestivo.

En 1957, Underdahl *et al.* aislaron y cultivaron un virus de un caso de Enfermedad de las Mucosas, aunque no pudieron reproducir la enfermedad. El virus produjo efecto citopático en las células del cultivo, causando vacuolización y muerte celular. En el mismo año, Lee y Gillespie propagaron un virus no citopático de casos de Diarrea viral bovina.

En 1960, Gillespie *et al.* cultivaron un virus citopático de un caso de Diarrea viral bovina en Oregón. Este virus, llamado Oregón C24V, fue inoculado en un bovino, que tuvo signos clínicos de la enfermedad y produjo anticuerpos que neutralizaron las cepas citopáticas y no citopáticas del virus. A partir de los estudios diseñados para caracterizar física y antigénicamente la naturaleza de estos nuevos virus, se pudo determinar que no sólo el virus de la Enfermedad de las Mucosas era muy similar al virus de la Diarrea Viral Bovina, sino que también éstos virus bovinos estaban relacionados con el virus de la enfermedad anteriormente denominada Cólera porcino (Darbyshire, 1962).

Coggins *et al.* (1961) elaboraron la primer vacuna comercial de la diarrea viral bovina, por 32 pasajes de la cepa de virus Oregón en cultivos celulares bovinos. El amplio uso de estas vacunas vivas modificadas fue asociada con numerosas complicaciones, incluyendo enfermedad de las mucosas inducidas por vacunación, fallas reproductivas y defectos congénitos (Bolin, 1995).

Si bien las lesiones macroscópicas de la Diarrea Viral y la Enfermedad de las Mucosas se consideraban indistinguibles, había aparentemente sustanciales diferencias en la enfermedad clínica. La Diarrea Viral Bovina era considerada enzoótica con brotes esporádicos de alta morbilidad pero baja mortalidad. Por el contrario, la Enfermedad de

las Mucosas afectaba animales jóvenes con baja morbilidad pero mortalidad cercana al 100%. Había muy poca evidencia que la enfermedad de las mucosas era contagiosa y los intentos de transmitir la enfermedad experimentalmente habían fallado. Cuando los investigadores trataron de reproducir la enfermedad de las mucosas con virus citopáticos aislados, la enfermedad resultante recordaba una diarrea viral bovina leve. Esta observación, tanto como la similitud en la distribución y la apariencia microscópica de las lesiones, contribuyeron a especular, sin convicción científica, que la diarrea viral y la enfermedad mucosa eran la misma enfermedad con algunas variaciones (Jubb y Kennedy, 1963)

Entre 1960 y 1970, las investigaciones se concentraron en las infecciones experimentales, particularmente en hembras preñadas y en terneros recién nacidos, para comprender la patogénesis del complejo diarrea viral bovina-enfermedad de las mucosas. Las infecciones intrauterinas con el virus de la diarrea viral bovina se asociaron con abortos y teratogénesis. También se observó que terneros nacidos infectados en útero con el vDVB eran de bajo peso, en general no sobrevivían más de unos pocos meses y eventualmente morían de enfermedad crónica de las mucosas (Malmquist, 1968; Kendrick, 1971).

Se descubrió que muchos terneros nacidos de madres infectadas durante la preñez temprana, antes del desarrollo del sistema inmunológico fetal, eran persistentemente infectados (PI) y no desarrollaban anticuerpos contra el vDVB (Braun *et al.*, 1973; Johnson y Muscoplat, 1973).

Mc Clurkin *et al.* (1984) informaron que estos terneros PI eran inmunocompetentes, capaces de desarrollar anticuerpos neutralizantes contra otros agentes infecciosos,

como los virus de la Rinotraqueítis infecciosa y Parainfluenza-3, y anticuerpos aglutinantes contra *Pasteurella hemolítica*.

Brownlie *et al.* (1984) pudieron discernir la patogenia de la enfermedad de las mucosas cuando reprodujeron experimentalmente esta enfermedad en un animal PI, inoculado con una cepa citopática del vDVB; se estableció entonces que la enfermedad de las mucosas sólo ocurría en animales PI superinfectados con una cepa citopática antigénicamente similar a la cepa no citopática que causaba la infección persistente.

Todas las investigaciones llevadas a cabo hasta el momento sobre el vDVB y la patogenia de las enfermedades que produce, así como su diagnóstico y control, fueron revisadas por Baker (1987) y Radostits y Littlejohns (1988). En estas publicaciones el vDVB está clasificado como un pestivirus, y junto con el virus de la enfermedad de la frontera de los ovinos (BDv) y el virus de la Peste porcina clásica (CSFv), dentro de la familia *Togaviridae*. Los casos de enfermedad clínica severa, con lesiones macro y microscópicas marcadas, fueron designados como Enfermedad de las mucosas. En contraste, la enfermedad leve asociada con signos clínicos mínimos, en los cuales se aislaba la cepa no citopática del vDVB, se comenzó a llamar Diarrea Viral Bovina.

La clonación molecular del genoma viral y la secuenciación completa del virus han permitido un análisis de su organización genética y su estrategia de replicación, por lo que los pestivirus se han reclasificado dentro de la familia *Flaviviridae* (Renard *et al.*, 1987; Collett *et al.*, 1988 a, b y c; Collett *et al.*, 1989).

La significación de la cepa no citopática era considerada sólo en la infección a la hembra preñada. En efecto, la transmisión secundaria entre animales inmunocompetentes se consideraba improbable o insignificante y la habilidad de esta

cepa de causar enfermedad severa fue un tanto descuidada en vista de dilucidar la patogenia de la enfermedad de las mucosas (Corapi *et al.*, 1989; Goens, 2002).

Sin embargo, a fines de 1980, en diversos países se observó un síndrome hemorrágico severo en bovinos adultos y terneras asociado con la cepa no citopática del vDVB, sin la presencia de la cepa citopática. Este síndrome estaba caracterizado por fiebre y marcada trombocitopenia debido a la diarrea sanguinolenta, epistaxis, hemorragias petequiales y equimóticas en superficies mucosas y sangrado en los sitios de inyección. También se observaron abortos en hembras preñadas, muertes súbitas y una mortalidad cercana al 25% (Rebhun *et al.*, 1989; Corapi *et al.*, 1989; Broes *et al.*, 1992; Carman *et al.*, 1998).

Se identificó el genotipo II del vDVB a partir de los síndromes de trombocitopenia y enfermedad aguda severa, utilizando anticuerpos mono y policlonales y PCR (Ridpath *et al.*, 1994; Ridpath y Bolin, 1998; Ridpath y Neill, 2000; Ridpath *et al.*, 2000; Ridpath *et al.*, 2006).

En nuestro país, Tarabla *et al.* (1980) confirman por laboratorio la existencia del virus en la Argentina. Carrillo *et al.* (1986), encuentran positivo a DVB el 41,6% de los sueros obtenidos en la provincia de Corrientes.

También en la Argentina se han encontrado casos de enfermedad severa producida por el genotipo II del vDVB, con brotes de enteritis aguda en bovinos jóvenes (Odeón *et al.*, 1998; Odeón *et al.*, 2003). Jones *et al.* (2001) realizaron la caracterización molecular de los aislamientos realizados en nuestro país.

II.2. Agente etiológico

II.2.1 Taxonomía

El virus de la diarrea viral bovina (vDVB), agente causal de la DVB, es miembro del género Pestivirus, perteneciente a la familia *Flaviviridae* (Renard et al., 1987; Collett *et al.*, 1988 a, b y c; Wengler, 1991)

II.2.1.1. Características generales de la familia *Flaviviridae*

La familia *Flaviviridae* comprende tres géneros, cuyos miembros tienen genomas y propiedades físico-químicas similares, pero son biológicamente muy diferentes. El género Flavivirus contiene más de 70 virus, 10 de los cuales son de importancia veterinaria, incluyendo los virus de Louping ill (Encefalomiелitis ovina), Encefalitis Japonesa, Wesselsbron y del Oeste del Nilo. Cerca de 30 miembros de este género tienen potencial zoonótico y pueden ser patógenos para el hombre, transmitidos por artrópodos. Estas enfermedades varían en su signología, desde fiebre y erupciones cutáneas, hasta fiebres hemorrágicas, encefalitis y hepatitis que comprometen la vida. El género Pestivirus contiene tres virus, que son de importancia veterinaria: el virus de la diarrea viral bovina, el virus de la Enfermedad de la Frontera de las ovejas y el virus de la Peste Porcina clásica. El género Hepacivirus contiene solamente patógenos humanos, los virus de la hepatitis C y G (Murphy *et al.*, 1999).

Los miembros de esta familia muestran similitudes en la morfología viral, organización del genoma y en las estrategias de replicación, pero exhiben diversas propiedades biológicas y carecen de reactividad serológica cruzada. Antes de la era de la biología molecular, los géneros Pestivirus y Flavivirus, que ahora pertenecen a la familia *Flaviviridae*, habían sido clasificados dentro de la familia *Togaviridae* (Lindenbach *et al.*, 2007).

Los viriones envueltos de esta familia están compuestos por una bicapa lipídica con dos o más tipos de glicoproteínas de envoltura (proteína E), que rodea a la nucleocápside, de simetría icosaédrica, la cual consiste en un genoma de ARN de cadena simple y sentido positivo, rodeado de múltiples copias de una proteína de la cápside pequeña y simple (proteína C). El ingreso a las células blanco se produce por endocitosis mediada por receptores específicos para las proteínas de la envoltura viral. Luego de perder la nucleocápside, el ARN viral es liberado en el citoplasma. El genoma viral cumple con tres roles dentro del ciclo de vida: sirve como ARN mensajero para la traducción de todas las proteínas del virus, como molde durante la replicación del ARN, y como material genético empaquetado dentro de las nuevas partículas virales. La organización del ARN genómico es similar en todos los géneros. Las proteínas virales son producidas como partes de una sola poliproteína, de más de 3.000 aminoácidos, que luego es cortada por proteasas del propio virus y también del hospedador. Las proteínas estructurales se encuentran en la porción amino terminal de la poliproteína y las proteínas no estructurales a continuación, en el resto de la poliproteína, hasta el grupo carboxilo terminal (Lindenbach *et al.*, 2007). Las secuencias genómicas que codifican una serina proteasa, una ARN helicasa y una ARN polimerasa son compartidas en los

tres géneros de ésta familia, y también poseen una ubicación parecida dentro de la poliproteína (Miller y Purcell, 1990).

II.2.1.2. Características generales del género Pestivirus

Los pestivirus infectan naturalmente sólo a los ungulados del Orden Artiodáctila. Los análisis de secuenciación genómica muestran que los tres virus que se encuentran en el género Pestivirus se relacionan estrechamente. Experimentalmente, comparten el espectro de hospedadores: el virus de la DVB puede infectar cerdos, ovejas y cabras, así como otros ungulados, y éstos animales pueden servir como reservorios; y el virus de la Peste porcina puede ser transmitida por bovinos (Baker, 1987; Paton, 1995; Murphy *et al.*, 1999). El virus de la Enfermedad de la Frontera y el vDVB han mostrado experimentalmente infección cruzada entre terneros y ovejas y ésta transmisión probablemente ocurre en condiciones naturales (Baker, 1987). Este cruce de especies también permite la diversificación característica del virus, ya sea por adaptación al nuevo hospedador o por evolución divergente. Sin embargo, el virus DVB aislado de cerdos y ovejas tiene características biológicas y antigénicas similares a los aislados de bovino (Paton, 1995). Si bien son posibles todos estos cruces de especies, en la naturaleza los virus son bastante específicos (Murphy *et al.*, 1999).

Los pestivirus no dependen de vectores artrópodos para su transmisión. Los virus de la Enfermedad de la Frontera de los ovinos y de la Diarrea Viral Bovina tienen una gran variación antigénica, a diferencia del virus de la Peste Porcina (Baker, 1987).

En contraste con los togavirus, los pestivirus tienen un único marco de lectura abierto, que luego es traducido a poliproteína (Collett *et al.*, 1988c).

Los pestivirus son poco estables en el medio ambiente, por lo que es improbable que persista en la atmósfera más allá de 14 días, teniendo en cuenta los estudios hechos con el virus de la peste porcina. Son susceptibles a la acción del calor, detergentes y desinfectantes como clorhexidina, iodóforos, fenólicos, aldehídos e hipoclorito (Rumenapf *et al.*; 1991). En cambio, y a diferencia de los flavivirus que son rápidamente inactivados a pH ácido, los pestivirus pueden sobrevivir a rangos relativamente amplios de pH (Krey *et al.*, 2005; Lindenbach *et al.*, 2007).

II.2.2. Estructura del virus de la Diarrea Viral Bovina

El vDVB es un virus ARN pequeño, esférico, de 40 a 60 nm de tamaño, con una envoltura lipídica muy apretada y adherente cubierta por peplómeros que rodea a la nucleocápside. Esta última es de naturaleza proteica y de simetría icosaédrica con un diámetro de 25 a 37 nm (Murphy *et al.*, 1999; Vadillo, 2002).

II.2.2.1. Genoma

La información genética del virus de DVB está codificada en una cadena simple de ARN de polaridad positiva, no segmentado, de aproximadamente 12,5 kilobases de longitud. Ha sido determinada la secuencia completa del virus, en el extremo 5' está ausente el capuchón o cap y el extremo 3' no está poliadenilado (Brock *et al.*, 1992). El

marco de apertura de lectura (ORF, open reading frame), de aproximadamente 4000 codones, está flanqueado por una región no codificante (UTR) en el extremo 5' de 372 a 385 nucleótidos y una UTR en el extremo 3' de 185 a 273 nucleótidos (Brock *et al.*, 1992; Collett *et al.*, 1988a). El ARN genómico sirve como ARN mensajero (Purchio *et al.*, 1984 b). La traducción del genoma viral genera una larga poliproteína, que es procesada durante y después de la traducción por proteasas celulares y virales, para dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus (Collett, 1992; Meyers y Thiel, 1996). (Figura 1)

En el extremo 5' del genoma son codificadas las cuatro proteínas estructurales que caracterizan al virus. Las proteínas no estructurales son siete u ocho y se codifican por las zonas del ARN más próximas al extremo 3' (Murphy *et al.*, 1999; Vadillo, 2002). El orden de los proteínas maduras en la poliproteína de vDVB es: NH₂-N^{pro}-C-E^{rns}-E₁-E₂-p7-NS2-3 (NS2-NS3)-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (Collett *et al.*, 1988b, Collett *et al.*, 1991; Meyers *et al.*, 1992, Lackner *et al.*, 2004).

5'UTR N^{pro} C E^{rns} E1 E2 p7 NS2-3 NS4A NS4B NS5A NS5B 3'UTR

Figura 1: Esquema del genoma del vDVB, que ilustra el orden de codificación de las proteínas virales. Las proteínas estructurales están sombreadas en gris, las no estructurales en amarillo. La región codificante está flanqueada por dos secciones no codificantes cortas (UTR: untranslated region) (Modificado de Liang *et al.*, 2003).

II.2.2.2. Proteínas virales

El primer evento de la biosíntesis del virus es la traducción del código genético en una poliproteína que es cortada durante y luego de la traducción de la misma para dar lugar a las diferentes proteínas estructurales y no estructurales del virus (Purchio *et al.*, 1984 a).

Proteínas Estructurales

- Proteína C, localizada en la nucleocápside (Vadillo, 2002) Es una pequeña proteína de 14 kDa, muy conservada entre los miembros de la familia *Flaviviridae*, rica en aminoácidos básicos, con un 21% de lys. Está localizada cerca del extremo amino de la poliproteína, entre la proteasa N^{pro} y la glicoproteína E^{ms}. Es liberada de la poliproteína por proteasas del propio virus y de la célula hospedadora. En el extremo amino terminal, el corte es realizado por la autoproteasa N^{pro} y el extremo carboxilo terminal es liberado por una proteasa celular que corta el sitio ubicado entre la Ala 267 y Asp 268 (Heimann *et al.*, 2006). Es la proteína más abundante, altamente inmunogénica e induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Donis *et al.*, 1988).

- Proteína E^{ms}, antiguamente conocida como E0 ó gp 44/48, por su peso de 44 a 48 kDa. Es un homodímero, cuyas subunidades están unidas por puentes di-sulfuro (Langedijk *et al.*, 2002). Está fuertemente glicosilada, es liberada de la poliproteína por peptidasas señal de la célula hospedadora, al igual que las proteínas E1, E2 y p7 (Lackner *et al.*, 2004). Es secretada por las células infectadas por exocitosis,

cumpliendo funciones de ribonucleasa en el espacio extracelular, pero la mayor parte de la proteína sintetizada es retenida dentro de la célula y unida a la envoltura viral, ya que se asocia a la membrana celular a través de su extremo carboxilo, quedando como proteína unida a la membrana (Fetzer *et al.*, 2005; Zoth *et al.*, 2001). Es responsable en parte de la inducción de los anticuerpos neutralizantes (Paton, 1995; Vadillo, 2002). Aunque la función ribonucleasa de esta proteína no está clara, parece ser importante ya que los anticuerpos que inhiben la actividad ribonucleasa tienden a neutralizar la infectividad del virus (Windisch *et al.*, 1996) y las mutaciones en E^{ms} que inactivan la actividad ribonucleasa generan virus atenuados in vivo (Meyer *et al.*, 2002). Si las mutaciones en E^{ms} se combinan con mutaciones en el genoma de N^{pro} pueden prevenir la infección persistente en fetos, ya que ambas proteínas contribuyen a bloquear la inducción de interferón y de esta manera, permiten al virus establecer infecciones persistentes. (Meyers *et al.*, 2007).

- Proteína E1, es una glicoproteína integral de la membrana que contiene 2 a 3 lugares de glicosilación N-ligados, y forma un heterodímero unido por puentes disulfuro (Weiland *et al.*, 1990).

- Proteína E2 (gp 53), es una glicoproteína integral de la membrana de la envoltura (Donis y Dubovi, 1987 a; Donis *et al.*, 1988). Contiene 4 a 6 puntos de glicosilación N-ligados y forma un homodímero unido por puentes disulfuro, y también un heterodímero con E1 (Weiland *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1994). La proteína E2 de la cepa NADL de vDVB posee cerca de 370 aminoácidos, el extremo amino terminal lo constituye la Arginina de la posición 690 y el carboxilo terminal esta ubicado alrededor del aminoácido 1063. El extremo carboxilo terminal incluye aproximadamente 30

aminoácidos, que podrían funcionar como anclaje transmembranoso (Donofrio *et al.*, 2006). Contiene una región hipervariable y altamente mutable. Es el sitio donde ocurren las mutaciones y cambios antigénicos que dan lugar a la aparición de cepas variantes del vDVB (Xue *et al.*, 1990; Paton, 1995; Van Oirschot *et al.*, 1999). Es esencial para la infectividad del virus, al igual que para determinar el tropismo del virus en cultivos celulares (Liang *et al.*, 2003). Esta glicoproteína contiene los epitopes que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes luego de una infección o vacunación. El mecanismo de neutralización de los anticuerpos inducidos por esta glicoproteína, parece ser la interferencia que se produce para que las partículas virales se unan a los receptores celulares y/o la fusión con la membrana endosómica, previniendo la liberación de la nucleocápside dentro del citosol (Donis *et al.*, 1988).

Proteínas No Estructurales

Las proteínas no estructurales son consideradas componentes de la membrana asociadas al complejo de replicación viral.

- Proteína p7: es un pequeño polipéptido hidrofóbico, de 6 a 7 kDa, que está codificada por una secuencia del genoma ubicada entre las secuencias de E2 y NS2-3. El clivaje entre E2 y p7 es realizada por una peptidasa señal de la célula hospedadora. Este clivaje a veces se produce en forma incompleta, resultando en proteínas E2-p7, E2 y p7. La proteína p7 es requerida para la producción de virus infecciosos, ya que se realizaron estudios experimentales y cuando no se produce el clivaje entre E2 y p7 no se obtienen partículas virales infectantes, sin embargo se produce la replicación del

ARN viral (Harada *et al.*, 2000). No está claro si la p7 es una proteína estructural o no estructural (Elbers *et al.*, 1996), pero en el virus de la Hepatitis C, de otro género de la familia Flaviviridae, la p7 forma un canal iónico, sugiriendo que podría tener una función en el ensamblaje y la entrada del virus (Griffin *et al.*, 2003). También p7 forma una secuencia señal para orientar apropiadamente la NS2 en la membrana (Agapov *et al.*, 2004).

- Proteína NS2-3 (p 125), es la proteína constituida por NS2 y NS3 unidas, y cuyo clivaje determina la citopatogenicidad del vDVB. Es esencial para la replicación del genoma viral, participa en el ensamblaje de las partículas virales y es requerida para la producción de partículas virales infecciosas (Agapov *et al.*, 2004). Es la más conservada en todos los pestivirus. Los animales infectados o vacunados con virus modificado desarrollan una fuerte respuesta humoral contra esta proteína responsable de las reacciones cruzadas con los virus de la Peste porcina y el virus de la Enfermedad de la frontera de las ovejas (Potgieter, 1995).

- Proteína NS2, es una cisteína proteasa identificada recientemente, muy conservada, que es responsable, en determinados casos, del procesamiento de NS2-3. La incorporación de un único aminoácido dentro de NS2 en la cepa vDVB identificada como CP7, es determinante para inducir el procesamiento eficiente de la NS2-3, y la expresión continuada de NS3, que se asocia con la cepa citopática del virus; por lo tanto esta proteína es un factor clave en el control de la patogenicidad del vDVB (Kummerer y Meyers, 2000; Lackner *et al.*, 2004). Meyers *et al.* (1996) encontraron una duplicación de 27 nucleótidos en la región codificante de NS2 de la cepa citopática de vDVB de referencia, CP7, que no tenía la cepa no citopática. De la misma manera, la

cepa citopática de referencia NADL, posee una inserción nucleotídica en la posición 270 en NS2, que potencia el clivaje parcial en NS2-3 (Méndez *et al.*, 1998).

- Proteína NS3 (p80), que surge a partir de NS2-3, es expresada en niveles altos en todas las cepas citopáticas de vDVB. Forma parte del complejo ARN polimerasa y tiene actividad proteasa, helicasa y NTPasa: posee actividad de serina-proteasa en el extremo amino terminal y actividad ARN-helicasa en el extremo carboxilo terminal (Paton, 1995; Warrener y Collett, 1995; Lackner *et al.*, 2004). Es esencial para la viabilidad del virus, ya que interviene en su replicación (Grassmann *et al.*, 1999). Esta última proteína es la responsable de los cortes que se realizan desde ella hacia adelante en la poliproteína, incluido su propio carboxilo terminal, entre NS3 y NS4A, NS4A y B, NS4B y NS5A, y NS5A y B, pero no del corte en NS2-3 (Xu *et al.*, 1997), mientras que las proteasas de la célula hospedadora se encargan del resto de las digestiones proteicas (Murphy, 1999; Vadillo, 2002). Hasta hace poco tiempo se sostuvo que ésta proteína sólo era expresada en el biotipo citopático del vDVB (Donis y Duvobi, 1987 b; Pocock *et al.*, 1987; Paton, 1995; Meyers and Thiel, 1996), pero investigaciones más recientes realizadas con la técnica de western blot demostraron la presencia de clivaje de NS2-3 y presencia de NS3 también en células infectadas experimentalmente con biotipos no citopáticos, luego de 5-6 horas post-infección, aunque a las 24 horas se vuelve indetectable. En cambio, en células infectadas con el biotipo citopático, la expresión de NS3 comenzó a hacerse evidente a las 8 horas post infección, y luego se mantuvo a niveles altos (Lackner *et al.*, 2004). Por esta razón, esta proteína es considerada el marcador de las cepas de vDVB citopáticas (Deregt y Loewen, 1995; Becher *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2007).

- Proteína NS4A, es un cofactor de la actividad proteasa de NS3. Es similar en tamaño y composición a NS4B (Xu *et al.*, 1997).
- Proteína NS5B, una ARN polimerasa dependiente de ARN (Collett *et al.*, 1988 a; Agapov *et al.*, 2004), que contiene la secuencia GDD (Gly-Asp-Asp), común de todas las polimerasas (Collett *et al.*, 1988 a, Xu *et al.*, 1997). Investigaciones recientes demuestran que esta proteína también es necesaria para el ensamblaje y la liberación de las partículas virales de la célula hospedadora (Ansari *et al.*, 2004).
- Proteína p20/ Npro , que a diferencia de las otras proteínas no estructurales, es la única proteína codificada en la primera porción del marco de lectura, en el extremo 5' (Stark *et al.*, 1993; Potgieter, 1995). Es una autoproteasa responsable del corte entre su carboxilo terminal y la siguiente proteína, la proteína C. Este es un sitio conservado de la poliproteína, entre la Cys-168 y la Ser-169 (Wiskerchen *et al.*, 1991; Stark *et al.*, 1993; Heimann *et al.*, 2006).

II.2.3. Variabilidad

A través de los años diferentes autores han investigado la diversidad genética, antigénica y patológica del vDVB (Bolin *et al.*, 1988; Corapi *et al.*, 1990; Xue *et al.*, 1990; Ridpath y Bolin, 1991; Ridpath *et al.*, 1994; Fulton *et al.*, 1997; Kreutz, *et al.*, 2000).

El estudio de la diversidad antigénica se ha intensificado con la separación del virus en dos genotipos. Estas diferencias antigénicas fueron detectadas utilizando paneles de

anticuerpos poli y monoclonales (Corapi *et al.*, 1990; Ridpath *et al.*, 1994; Bolin *et al.*, 1988; Ridpath y Bolin, 1991; Fulton *et al.*, 1997; Kreutz *et al.*, 2000).

Esta variabilidad, que afecta la virulencia, puede ser producida por mutaciones, que pueden ser puntuales (cambio o delección de un solo nucleótido), o delección de una sección del genoma, recombinaciones y duplicaciones (Goens, 2002).

Las mutaciones de punto son muy comunes en los virus ARN, debido a que las polimerasas virales carecen de actividad exonucleasa que pueda corregir las bases mal incorporadas. El virus DVB sobrevive de ésta manera, originando cepas mutantes que escapan a la respuesta inmunológica del hospedador. Se han observado delecciones de 3102 nucleótidos en un par de vDVB aislados de un animal con enfermedad de las mucosas (Donis, 1995).

Makoschey *et al.* (2004), propusieron la utilización de cepas de vDVB con delecciones en la región 5' UTR para la elaboración de vacunas, ya que realizaron desafíos con animales vacunados con estas cepas mutantes, y obtuvieron altos títulos de anticuerpos neutralizantes, redujeron la replicación del virus y previnieron la viremia.

Las recombinaciones ocurren también en el vDVB, y han sido bien caracterizadas. Ciertas secuencias de ARN de la célula hospedadora son insertadas en la secuencia de nucleótidos del genoma viral, algunas veces acompañadas con duplicaciones o cambios de las secuencias virales, o ambos (Meyers *et al.*, 1996; Goens, 2002). La recombinación en el genoma codificante de la proteína NS2 del virus es responsable de la expresión de NS3, que caracteriza a las cepas citopáticas de vDVB (Meyers *et al.*, 1996; Vilcek *et al.*, 2000; Lackner *et al.*, 2004). Nagai *et al.* (2003) encontraron recombinaciones en otras regiones del genoma viral, que codifican las proteínas

estructurales, específicamente entre N^{pro} y la proteína C. La inoculación experimental de un infectado persistente con una cepa citopática heteróloga a la cepa no citopática persistente, desencadenó la producción de un virus quimérico, originado por recombinación, inserción de genes celulares y duplicación del RNA viral (codificante de N^{pro} y C). Este virus originó la enfermedad de las mucosas en el animal persistentemente infectado, porque por recombinación se originó la cepa citopática homóloga a la cepa no citopática que poseía el infectado persistente.

Becher *et al.* (2001) investigaron el origen de dos cepas citopáticas que fueron aisladas de casos diferentes de enfermedad de las mucosas, y los análisis moleculares de ambas sugirieron fuertemente que las mismas surgieron de recombinaciones entre las cepas no citopáticas persistentes y una cepa vacunal RIT de vDVB.

Las recombinaciones también fueron descritas en el genotipo II del virus DVB, provocando la aparición del biotipo citopático (Ridpath y Bolin, 1995; Ridpath y Neill, 2000; Neill y Ridpath, 2001).

II.2.4. Clasificación

Teniendo en cuenta la variabilidad genética y antigénica, y su estrecha relación con otros miembros del género pestivirus, la clasificación del vDVB ha sido difícil y ha ido cambiando a medida que las nuevas investigaciones aportaban nuevos conocimientos sobre el virus y sus variantes. El análisis molecular de ciertas regiones del genoma y la utilización de anticuerpos monoclonales permitió dividir a los vDVB en genotipos. Por

el efecto que produce el virus en cultivos celulares se los subdividió en dos biotipos, citopático y no citopático

II.2.4.1. Genotipos

A través de estudios de secuenciamiento genético, teniendo en cuenta la región 5'UTR y la zona del genoma que codifica la proteína NS2-3 (p125), el vDVB fue segregado en dos genotipos: vDVB1 y vDVB2 (Pellerín *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). La región 5'UTR no codifica ninguna proteína, sin embargo, está altamente conservada y posee un sitio de entrada al interior del ribosoma para el inicio de la traducción del marco de lectura del ARN (Poole *et al.*, 1995). Comparando ambos genotipos con los demás pestivirus, los análisis filogenéticos sugirieron que el genotipo 1 y 2 del vDVB son tan diferentes uno del otro como el vDVB 1 es diferente del virus de la peste porcina clásica (Ridpath *et al.*, 1994).

Estudios posteriores realizados con PCR revelaron que dentro del genotipo 1 se pueden diferenciar dos subgenotipos, llamados vDVB 1a y vDVB 1b (Ridpath y Bolin, 1998). Estos subgenotipos también poseen diferencias antigénicas, por lo que es posible detectarlos utilizando anticuerpos monoclonales (Bolin y Ridpath, 1998).

En la actualidad, el genotipo 1 se considera subdividido en por lo menos 11 genogrupos, también en base a las secuencias codificantes de N^{pro} y la región UTR. Estos genogrupos son menos claramente diferenciados por anticuerpos monoclonales, lo que sugiere que las similitudes antigénicas dentro del genotipo I son significativas (Vilcek *et al.*, 2001).

Además de las diferencias genómicas, los dos genotipos difieren en su comportamiento patogénico: el I fue aislado de cuadros de diarrea y enfermedad de las mucosas y el genotipo II fue aislado en animales que murieron afectados de la forma severa aguda de DVB, en terneros con infección persistente nacidos de vacas vacunadas y en suero fetal (Ridpath *et al.*, 1994). Cuando aparecieron los cuadros hemorrágicos en los años 80, y más tardíamente los cuadros severos agudos, se aisló el genotipo II del vDVB. Sin embargo, la secuenciación de aislamientos que se habían realizado antes confirmó que este genotipo II existía mucho tiempo antes de la aparición de los cuadros severos de DVB (Carman *et al.*, 1998). El tipo II de vDVB ha sido aislado de otras partes del mundo donde no se han reportado casos severos agudos, o éstos son raros (Bolin y Ridpath, 1998; Nagai *et al.*, 1998; Liebler-Tenorio *et al.*, 2003). Como contrapartida, Gollán *et al.* (2006) investigaron un caso de síndrome purpúrico provocado por el vDVB genotipo I. El cuadro era muy parecido clínica y patológicamente a los casos que fueron descritos como provocados por el genotipo II, pero los estudios de secuenciación genómica demostraron que el virus aislado presentó mayor homología con el genotipo I.

Goens (2002) considera que la categorización del vDVB por genotipos podría tener menor trascendencia, ya que la virulencia podría estar asociada con más de una región variable, que existen a lo largo de las regiones codificantes de las proteínas estructurales y no estructurales y en la región 3' no codificante.

II.2.4.2. Biotipos

El vDVB presenta dos biotipos diferenciados por sus efectos en cultivo celular: biotipo citopatogénico (CP) y biotipo no citopatogénico (NCP) (Baker, 1987; Brownlie, 1990). El biotipo o cepa citopática provoca importantes lesiones en células de cultivos celulares, desde vacuolización hasta muerte celular. El biotipo o cepa no citopática no causa cambios microscópicos visibles en el cultivo celular y la célula infectada parece normal. Los biotipos son clasificados por su habilidad o no de causar cambios citopáticos en cultivos celulares, sin considerar la capacidad de causar enfermedad en el animal (Deregt y Loewen, 1995).

Existe amplia evidencia de que el biotipo NCP puede ser patogénico en vivo, es el que predomina en la naturaleza, es aislado de la mayoría de las formas clínicas (Tabla 1) y es el único capaz de originar inmunotolerancia e infección persistente en animales clínicamente normales (Mc. Clurkin *et al.*, 1984; Deregt y Loewen, 1995; Paton, 1995). Sin embargo, algunos bovinos persistentemente infectados nacen pequeños y débiles y tienen retraso marcado en el crecimiento (Baker, 1987; Radostits y Littlejohns, 1988). Experimentalmente, el biotipo NCP parece causar abortos más fácilmente que el biotipo citopático, a pesar que esta última también puede atravesar la placenta (Mc Clurkin *et al.*, 1984; Mc Clurkin *et al.*, 1985; Bolin y Mc Clurkin, 1985; Brownlie *et al.*, 1989). De acuerdo a recientes investigaciones, el biotipo NCP también puede causar enfermedad severa, en terneros y en animales adultos (Corapi *et al.*, 1989; Rebhun *et al.*, 1989; Pellerín *et al.*, 1994; Carman *et al.*, 1998). En contraste, a pesar de que el biotipo CP del virus es capaz de atravesar la placenta e infectar al feto, no

establece infección persistente, y por eso, no tiene la habilidad de perpetuarse en un rodeo (Mc Clurkin *et al.*, 1984; Brownlie *et al.*, 1989).

Tabla 1: vDVB, biotipos y enfermedad. Modificado de Deregt y Loewen, 1995.

Biotipos no citopáticos y citopáticos de vDVB en la enfermedad leve y severa y en la infección persistente			
Enfermedad	NCP ^a	CP ^b	Signos observados
DVB leve ^c	+	+	Fiebre, diarrea, recuperación
Infección persistente ^d	+	-	Enfermedad mucosa, familias de PI
Enfermedad mucosa ^e	+	+	Enfermedad fatal, aguda o crónica
Trombocitopenia ^f	+	-	Hemorragias, muerte o recuperación
DVB severa ^f	+	-	Síndrome similar a enf. Mucosa, muerte o recuperación.

^a: NCP: no citopático
^b: CP: citopático
^c: Tanto el biotipo citopático como el no citopático pueden causar enfermedad leve
^d: PI: persistentemente infectado, debido a una infección congénita
^e: Ambos biotipos están asociados con esta enfermedad. Solo los PI son susceptibles
^f: Biotipos no citopáticos virulentos de vDVB son responsables de esta enfermedad.

Los dos biotipos del vDVB no son distinguibles serológicamente (Radostits y Littlejohns, 1988). Sin embargo, a nivel molecular, se ha descubierto que en células infectadas, el biotipo CP produce una proteína adicional no expresada en células infectadas con el biotipo NCP (Donis y Dubovi, 1987 b; Pocock *et al.*, 1987; Bielefeldt Ohmann, 1988 b; Deregt *et al.*, 1990). Esta proteína es la llamada NS3 o p80, aunque no se haya probado, está relacionada con la citopatogenicidad del biotipo CP en cultivos celulares (Deregt y Loewen, 1995). Tanto la p125 (NS2-3) como la p80 (NS3) son

proteasas virales. Una posible explicación del daño celular que produce este biotipo en cultivos celulares, es que la p80 rompe y destruye proteínas celulares importantes, mientras que la p125 no lo hace (Wiskerchen y Collett, 1991).

La existencia de la proteína p80 y del biotipo CP es evidentemente el resultado de cambios genéticos del biotipo NCP. Esto explica el gran nivel de similitud antigénica encontrado entre ambos biotipos del vDVB; además se aísla de animales que presentan el cuadro clínico de la enfermedad de las mucosas, que aparece espontáneamente en animales en los que se aíslan siempre ambos biotipos (Paton, 1995).

Los análisis de secuenciamiento del genoma han mostrado que las alteraciones genéticas que derivan en la expresión de NS3 son inserciones de material genético celular y duplicaciones, reordenamientos o deleciones de genes virales (Meyers *et al.*, 1992; Donis, 1995; Meyers *et al.*, 1996; Vilcek *et al.*, 2000; Becher *et al.*, 2001; Goens, 2002; Lackner *et al.*, 2004).

Algunas cepas mantienen su citopatogenicidad en una gama amplia de huéspedes, mientras otros cambian a medida que pasan por el mismo o diferentes hospedadores (Baker, 1987).

II.3. Epidemiología

II.3.1: Fuentes de infección

Los bovinos persistentemente infectados constituyen la principal fuente de infección y reservorio del virus, ya que eliminan grandes cantidades de virus a través de sus

secreciones, en forma constante y durante toda la vida. (Brock *et al.*, 1998; Houe, 1999; Lindberg y Houe, 2005, Morán *et al.*, 2006). Actualmente todos los programas de control de la enfermedad están dirigidos a eliminar estos animales del rodeo (Houe, 1995; Houe, 1999; Bitsch *et al.*; 2000; Jayashi *et al.*; 2005).

Los animales que cursan una infección aguda también son fuente de infección, aunque en forma menos eficiente, ya que eliminan virus en pequeñas cantidades y por un período corto durante la infección (Brownlie *et al.*, 1987).

También se ha demostrado la transmisión entre pequeños rumiantes y bovinos, en ambas direcciones (Baker, 1987; Paton, 1995).

II.3.2: Modos de transmisión

La transmisión puede ser horizontal o vertical. A su vez, la transmisión horizontal puede ser directa e indirecta. Una vía muy eficiente de transmisión directa es el contacto nariz con nariz de animales susceptibles con infectados persistentes (Houe, 1995; Houe, 1999; Braun *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 2005); también el contacto directo con animales infectados en forma aguda puede transmitir el virus, aunque menos eficientemente (Meyling *et al.*, 1990). Niskanen *et al.* (2002) no pudieron infectar terneros susceptibles que estuvieron en estrecho contacto con animales infectados en forma aguda, a pesar de sufrir infecciones concurrentes con Coronavirus. La transmisión puede realizarse también a partir del contacto con saliva infectada, descarga oculo-nasal, orina, heces, secreciones uterinas, líquido amniótico, o placenta que contenga virus (Baker, 1987).

La transmisión horizontal indirecta ha sido demostrada experimentalmente y depende del tiempo de exposición, temperatura y dosis infectante (Lindberg, 2002). La transmisión puede realizarse a través del uso de agujas hipodérmicas, mochetas, guantes de palpación rectal (Houe, 1995; Houe, 1999; Niskanen y Lindberg, 2003) y la acción de insectos hematófagos, minutos después de haber estado en contacto con animales PI. Sin embargo, su importancia práctica aún no está clarificada, ya que es un virus que se inactiva fácilmente por calor, desecación, luz ultravioleta, detergentes y solventes orgánicos (Tremblay, 1996).

Cuando el virus es bien preservado dentro de un vehículo, por ejemplo semen criopreservado de toros PI o con infección aguda, embriones para transferencia contaminados (Fray *et al.*, 1998) o líquidos inyectables contaminados, el potencial de diseminación se incrementa (Lindberg, 2002).

El virus también es un contaminante frecuente del suero fetal bovino, un componente normalmente usado en los cultivos celulares, por ésta razón los productos biológicos pueden estar contaminados (Rossi *et al.*, 1980; Bolin y Ridpath, 1998; Zabal *et al.*, 2000). También se ha comprobado la transmisión del virus a través del uso de vacunas a virus vivo modificado o vacunas contaminadas (Houe, 1999; Becher *et al.*, 2001; Niskanen y Lindberg, 2003).

La transmisión vertical ocurre en hembras susceptibles infectadas durante la preñez. Una característica de los pestivirus de rumiantes, que incluyen el vDVB en bovinos y el virus de la enfermedad de la frontera de las ovejas, es la habilidad de éstos virus de atravesar la placenta en animales seronegativos e infectar al feto. Para el feto, el efecto de la infección depende del estadio de la gestación en la cual la hembra es infectada y

de la cepa del virus. En bovinos, la infección del feto con una cepa NCP desde los 30 a 40 días de la gestación, y hasta alrededor de los 120 días, momento en el cual el feto adquiere competencia inmunológica, resultará en un ternero infectado persistente, específicamente inmunotolerante para el vDVB que ha infectado al feto. Estos animales son susceptibles a una superinfección con el biotipo CP del virus, con lo que se puede producir la enfermedad de las mucosas, que es siempre fatal. Los terneros PI con el biotipo NCP de vDVB pueden ser débiles al nacimiento, pero frecuentemente son clínicamente normales. La infección con DVB puede también resultar en muerte fetal, reabsorción, aborto, momificación y malformaciones congénitas (Baker, 1987; Moennig y Liess, 1995; Fredriksen *et al.*, 1999 a y b). A pesar de la elevada tasa de mortalidad de los animales PI en el primer año de vida (más del 50%), muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen. Las crías de éstos animales también serán PI (Baker, 1987).

La transmisión vertical también ocurre luego de la transferencia embrionaria, si el receptor es PI y si el donante también lo es, y no se efectúa un correcto lavado del embrión (Houe, 1995; Houe, 1999).

II.4. Patogenia

II.4.1. Ingreso del virus a la célula

La unión y entrada del vDVB a la célula hospedadora involucra una serie de pasos como la adherencia de los viriones, la interacción con receptores específicos, la

internalización y la fusión de membranas (Lindenbach *et al.*, 2007). La unión a las células blanco involucra a las glicoproteínas de envoltura E^{ns} y E2 (Liang *et al.*, 2003). La proteína E^{ns} interactúa con los glucosaminoglucanos de la superficie celular (Iqbal *et al.*, 2000) y E2 lo hace con proteínas de membrana (Xue y Minocha, 1993). Los receptores del vDVB incluyen CD46 (Maurer *et al.*, 2004) y el receptor de la LDL (Agnello *et al.*, 1999). Como los miembros del género Flavivirus, los pestivirus ingresan a la célula blanco por endocitosis mediada por receptor (Agnello *et al.*, 1999; Maurer *et al.*, 2004; Lindenbach *et al.*, 2007), a través de vesículas cubiertas de clatrina (Krey *et al.*, 2005; Lecot *et al.*, 2005). Como la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula requiere pH ácido, ésta se produce a nivel del endosoma (Krey *et al.*, 2005; Lecot *et al.*, 2005). A pesar de que el vDVB es resistente a los tratamientos ácidos, la acidificación en el endosoma provoca la fusión con la envoltura viral por cambios conformacionales irreversibles en las proteínas virales. Durante la vía endocítica, estas proteínas deben ser preparadas, a través de la reducción de los puentes disulfuro, para que pueda luego realizarse la unión entre la envoltura viral y la membrana endosómica en condiciones de pH ácido (Krey *et al.*, 2005).

Luego de la fusión, se desarma la nucleocápside, el ARN viral es liberado dentro del citoplasma celular y comienza la replicación viral (Hietala y Crossley, 2005).

II.4.2. Replicación viral

La replicación del ARN requiere NS3 y NS5B así como también componentes celulares. En el proceso de la replicación vírica se lleva a cabo la síntesis de ARN de

polaridad negativa, que luego sirve como molde para la síntesis de ARN de polaridad positiva. Para que ésta última ocurra es necesario que se ponga en marcha un mecanismo regulador complejo en el que intervienen distintos componentes celulares del hospedador (Murphy *et al.*, 1999; Vadillo, 2002). Se han detectado cadenas de ARN de polaridad positiva y negativa desde 4 a 6 horas post infección, a partir de allí la tasa de síntesis de ARN de cadena positiva se incrementa rápidamente, mientras que la síntesis de ARN de polaridad negativa permanece constante (Gong *et al.*, 1996).

El genoma vírico actúa como ARN mensajero. En la traducción del mensaje genético se forma una única proteína, de cerca de 4000 aminoácidos, que es cortada y procesada hasta dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus (Purchio *et al.*, 1984 a y b).

II.4.3. Ensamblaje y liberación de partículas virales

Ward y Kaeberle (1984) utilizaron técnicas de inmunoperoxidasa en cultivos celulares inoculados con el virus y observaron con microscopía electrónica partículas virales asociadas a las membranas del retículo endoplásmico. Estudios realizados con anticuerpos monoclonales, para investigar el mecanismo de liberación de las partículas virales de las células infectadas, detectaron las glicoproteínas de envoltura E^{ms} y E2 en las membranas intracelulares y no en la superficie celular. (Weiland *et al.*, 1999; Grummer *et al.*, 2001). Estas proteínas ocasionalmente fueron detectadas en la superficie celular, pero son atribuidas a la presencia de partículas virales acumuladas en la misma (Weiland *et al.*, 1999). Mas recientemente, se ha demostrado que la E2 tiene

una señal de localización intracelular que es la responsable de la retención de esta proteína en el retículo (Köhl *et al.*, 2004). Pudo concluirse entonces que el ensamblaje de los elementos víricos se produce en el retículo endoplásmico, y luego los nuevos virus utilizan la vía secretoria de la célula hospedadora y salen al exterior por exocitosis o mediante lisis celular (Grummer *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 1999; Vadillo, 2002; Lindenbach *et al.*, 2007). Las proteínas no estructurales del virus NS2-3 y NS5B juegan un rol en el ensamblaje y la liberación de los viriones (Agapov *et al.*, 2004; Ansari *et al.*, 2004).

II.4.4. Cuadros clínicos producidos por el vDVB

La patogenia de los diversos cuadros que el vDVB puede producir en bovinos está sujeta a diversas características de la infección, como la ocurrencia de viremia, la habilidad del virus de comprometer el sistema inmunológico, la ocurrencia de infecciones transplacentarias, la inducción de inmunotolerancia y la aparición de la competencia inmunológica en fetos. Aparte de aquellos infectados en el útero, muchos bovinos son inmunocompetentes para el virus y podrán controlar satisfactoriamente la infección natural, desarrollar anticuerpos y eliminar el virus. De acuerdo a esto, la infecciones se separan en post-natales y fetales. (Radostits y Littlejohns, 1988). La enfermedad de las mucosas siempre surge en terneros infectados en el útero, nacidos PI y superinfectados con un biotipo CP (Brownlie *et al.*, 1984; Bolin *et al.*, 1985; Baker, 1987; Radostits y Littlejohns, 1988).

II.4.4.1 Infecciones post-natales en bovinos susceptibles, inmunocompetentes y no preñados

En bovinos inmunocompetentes, susceptibles y no preñados, los cuadros clínicos posibles son:

- Infecciones subclínicas: El 70 a 90% de las infecciones en bovinos adultos susceptibles son subclínicas; los animales pueden tener hipertermia leve y leucopenia, seguida por el desarrollo de anticuerpos neutralizantes (Baker, 1987).
- Diarrea Viral Bovina: este cuadro, que dió nombre al virus, se refiere a la infección aguda que ocurre en bovinos seronegativos e inmunocompetentes, generalmente entre los 6 meses a dos años de edad. Tras un período de 5 a 7 días, se puede observar leve depresión, inapetencia, descarga oculonasal y ocasionalmente lesiones orales caracterizadas por erosiones o ulceraciones poco profundas. Los animales pueden tener diarrea. La morbilidad es elevada, pero la mortalidad es baja ó nula. En vacas lactantes la producción de leche puede disminuir. El virus puede ser eliminado en bajas concentraciones por el ganado infectado y puede hacerse aislamiento viral de las secreciones o excreciones corporales. En éstos animales puede realizarse seroconversión. Los anticuerpos neutralizantes son detectados en el suero 3 a 4 semanas después de la infección y probablemente persistan por años (Baker, 1987; Radostits y Littlejohns, 1988).
- Infecciones en terneros neonatos: Los fetos pueden infectarse en el último trimestre de la gestación o pueden hacerlo en el período neonatal, y desarrollan una enteritis severa que algunas veces es fatal (Baker, 1987). Esta enteritis ha sido inducida

experimentalmente en terneros calostrados y no calostrados, sugiriendo que el virus podría tener un importante rol en la diarrea neonatal de los terneros en combinación con otros patógenos entéricos (Lambert y Fernelius, 1968). En terneros que calostraron más tiempo (4 a 6 meses), la infección resulta en una enfermedad clínica leve con rápida recuperación. La inmunidad pasiva humoral en terneros aparece como protectora después de la infección. La administración de corticoides a terneros sin anticuerpos calostrales ha provocado viremias fatales, mientras que no produjo enfermedad en animales con altos niveles de anticuerpos calostrales (Shope *et al.*, 1976). Los anticuerpos derivados de la inmunidad pasiva declinan hasta niveles indetectables entre los 105 a 230 días, pero con altas concentraciones iniciales pueden persistir más de un año. Al disminuir los anticuerpos pasivos, los títulos se incrementan luego de la exposición natural y la infección (Baker, 1987).

- Inmunosupresión: Si bien el virus afecta primariamente el sistema digestivo, también posee una gran afinidad por el tejido linforeticular. Se ha comprobado la actividad inmunosupresora del virus, que puede potenciar la patogenicidad de microorganismos co-infectantes como *PI₃*, *IBR*, *Coronavirus*, *Rotavirus*, *Pasteurella*, *Salmonella*, *Coccidios*, etc. (Baker, 1987). Más del 85% de los animales infectados pueden también ser bacteriémicos. Los mecanismos por los cuales el virus produce inmunosupresión se han investigado recientemente e incluyen: la supresión de la producción de interferón, disminución de la respuesta de linfocitos periféricos a una variedad de mitógenos, disminución del número absoluto de linfocitos B y T circulantes y del porcentaje de linfocitos T, alteración de la producción de anticuerpos humorales, disminución de la quimiotaxis de monocitos, alteración de la función de polimorfonucleares, alteración de

la secreción de inmunoglobulinas de linfocitos periféricos, inducción de bacteriemias espontáneas y alteración del clearance bacteriano de la sangre y del clearance de Herpesvirus bovino tipo 1 de los pulmones (Baker, 1987). Glew *et al.* (2003) demostraron que las células presentadoras de antígenos son susceptibles a la infección por el virus, pero las células dendríticas son más resistentes que los monocitos a sus efectos. Después de la infección, pueden encontrarse focos de necrosis en los linfonódulos del bazo y destrucción de placas de Peyer en el intestino delgado, menor diferenciación entre las zonas medular y cortical de los ganglios linfáticos y atrofia del tejido linfático en general (Murphy *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2007). Puede desarrollarse una profunda leucopenia y anemia en las etapas tempranas de la enfermedad, que persiste por semanas. Trabajos realizados con técnicas inmunohistoquímicas en médula ósea de bovinos experimentalmente infectados, han localizado antígeno viral en megacariocitos y células mieloides (Spagnuolo *et al.*, 1997). Corapi *et al.* (1989) encontraron que la infección aguda con cepas NCP de vDVB ha causado trombocitopenia, neutropenia, anemia y linfopenia en bovinos. Gollán *et al.* (2006) encontraron marcada trombocitopenia y leucopenia. También han sido encontrados signos de necrosis en la médula ósea de bovinos adultos con trombocitopenia, con pérdida de la arquitectura, cariorrexis y fagocitosis de restos celulares (Ellis *et al.*, 1998; Rebhun *et al.*, 1989). También las vacunas de DVB a virus vivo modificado han demostrado ser inmunosupresivas. Mientras el uso de éstas vacunas en un rebaño no estresado y bien alimentado sólo provoca bajo riesgo, el uso concomitante en condiciones como destete, transporte y otras condiciones estresantes de un feed-lot puede provocar enfermos (Baker, 1987).

- Enfermedades respiratorias: el vDVB ha sido asociado con signos clínicos y lesiones de enfermedad respiratoria (Baker, 1987; Baker, 1995; Baule *et al.*, 2001; Shahriar *et al.*, 2002; Fulton *et al.*, 2005; Confer *et al.*, 2005). En un estudio de muestras clínicas, las biotipos NCP fueron aislados más frecuentemente que los CP, y el genotipo I más frecuentemente que el II. El genotipo I también fue aislado con mayor frecuencia que el II en muestras de necropsia de bovinos con neumonía fibrinosa (Fulton *et al.*, 2000). También se ha comprobado que existe sinergismo con otros patógenos respiratorios (Potgieter *et al.*, 1985; Richer *et al.*, 1988; Shahriar *et al.*, 2002; Confer *et al.*, 2005); tanto el biotipo CP como el NCP causaron enfermedad respiratoria cuando eran seguidos de la inoculación con *Pasteurella*, pero el biotipo CP fue asociado con enfermedad más severa (Potgieter *et al.*, 1985). Además, se ha identificado que ciertos aislamientos de vDVB actúan como agentes primarios de neumonías (Baule *et al.*, 2001).

- Infección aguda severa: Hasta hace poco se prestaba poca atención a las infecciones agudas, porque se consideraban leves, subclínicas y de muy baja mortalidad (Baker, 1987; Radostits y Littlejohns, 1988). Sin embargo, cada vez son más frecuentes los informes de infección aguda severa de alta virulencia en animales jóvenes y adultos, que provoca elevada morbilidad y mortalidad, causada principalmente, aunque no exclusivamente, por el genotipo II del vDVB. Los signos clínicos son generalmente severos, con diarrea, abortos, muertes súbitas ó neumonías. Las lesiones son similares a la enfermedad de las mucosas. Sin embargo, se diferencia de ésta última porque sólo se aísla el biotipo NCP del vDVB. (Deregt y Loewen, 1995; Ridpath *et al.*, 2006).

- Síndrome hemorrágico: Este cuadro también está asociado con el biotipo no citopático de vDVB y ha sido estudiado por muchos investigadores (Rebhun *et al.*, 1989; Corapi *et al.*, 1989; Flores *et al.*, 2000; Ridpath *et al.*, 2000; Ridpath *et al.*, 2006; Gollán *et al.*, 2006). Se observan hemorragias petequiales y equimóticas en múltiples sistemas orgánicos, diarrea sanguinolenta, epistaxis, sangrado en sitios de inyección, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte (Corapi *et al.*, 1989). Después de la infección con éstas cepas virulentas, se ha observado asociación del virus con linfocitos y plaquetas. En las plaquetas fue hallado el virus, pero no fueron encontradas inmunoglobulinas unidas a la superficie, y en la médula ósea se han hallado megacariocitos hiperplásicos y no infectados. Se ha sugerido entonces que la trombocitopenia inducida por la infección con el vDVB virulento es debido a un efecto directo del virus sobre las plaquetas, resultando en su reclutamiento o destrucción, más que por la disminución en su producción. También se ha postulado que las mismas pueden actuar como transportadoras del virus. (Corapi *et al.*, 1990). Otros autores, sin embargo, han encontrado signos de necrosis en la médula ósea, con pérdida de la arquitectura, cariorrexis y fagocitosis de restos celulares (Ellis *et al.*, 1998; Rebhun *et al.*, 1989).

- Fallas reproductivas: Son las que provocan el mayor impacto económico de las infecciones por vDVB (Moennig y Liess, 1995; Grooms *et al.*, 1998 b). En las hembras, la infección aguda provoca cambios que alteran la función ovárica y reducen la fertilidad (Grooms *et al.*, 1998 a y b; Fray *et al.*, 1998; Fray *et al.*, 2000 a). Se han descrito ooforitis de variable severidad, luego de una infección aguda, que perduraron por más de 60 días (Ssentongo *et al.*, 1980; Grooms *et al.*, 1998 a y b). Se han encontrado antígenos de vDVB en las células del estroma ovárico y en los oocitos en

todos los estadios de maduración de los folículos ováricos (Fray *et al.*, 1998; Fray *et al.*, 2000 a), y una disminución significativa en los niveles de estradiol plasmático acompañando a la infección aguda (Fray *et al.*, 2000 a). En los machos, el semen de toros persistentemente infectados contiene virus que puede infectar a animales susceptibles. El semen de toros inmunocompetentes que cursan una infección aguda puede ser transitoriamente infectante. La calidad del semen puede ser afectada por el virus y se caracteriza por motilidad disminuída y anormalidades morfológicas de los espermatozoides. Las vacas seronegativas inseminadas con semen infectado generalmente fallan en la concepción hasta que desarrollan respuesta inmune activa contra el virus (Mc Clurkin *et al.*, 1979).

II.4.4.2. Infecciones transplacentarias

Si el vDVB infecta una vaca o vaquillona preñada y no inmune, el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria e invadir al feto, lo cual ocurre con gran eficiencia (Moennig y Liess, 1995). El principal determinante de la respuesta fetal a la infección es la edad del feto al momento de la infección y el biotipo del virus infectante (Vanroose *et al.*, 1998). La infección congénita puede resultar en amplio espectro de anormalidades, como reabsorción embrionaria, aborto, momificación, malformaciones congénitas, nacimiento de terneros de bajo peso y tamaño, nacimiento de terneros persistentemente infectados con el vDVB, y nacimiento de terneros normales (Baker, 1987; Radostits y Littlejohns, 1988).

En la etapa embrionaria, de los 0 a los 45 días, la infección de una hembra susceptible próxima al momento del servicio o la inseminación ocasiona muerte embrionaria y repeticiones de servicios, hasta que desarrolla respuesta inmune (Mc Clurkin *et al.*, 1979). Los hallazgos más notables en éstos rodeos pueden ser el aumento de servicios por concepción, y en el intervalo parto-concepción (Muñoz-Zanzi *et al.*, 2004). Además, la replicación del virus en células del oviducto puede alterar la secreción de factores embriotrópicos que permiten el desarrollo embrionario (Vanroose *et al.*, 2000). Vanroose *et al.* (1998) concluyeron que los embriones bovinos son susceptibles a la infección con vDVB cuando la zona pelúcida es removida, cerca del día 8 o 9. No obstante, el vDVB es capaz de infectar a los ovocitos cuando ellos maduran dentro de los folículos ováricos, antes que se forme la zona pelúcida o bien a través de las prolongaciones que emiten las células del cúmulo, que penetran la zona pelúcida y entran en íntimo contacto con el oolema (Fray *et al.*, 1998; Fray *et al.*, 2000 a). Fray *et al.* (1998), encontraron que la proteína no estructural NS3 fue localizada dentro del 18,7% de los ovocitos, lo que demuestra que las células germinales bovinas pueden soportar la replicación viral, y que la zona pelúcida intacta no es garantía de que el embrión esté libre de vDVB. Por ende, la infección con el vDVB puede realizarse a través de la línea germinal (Fray *et al.*, 2000 a).

Por otro lado, el virus no parece inhibir la concepción en bovinos seronegativos o seropositivos cuando se inocula por vía oral o intranasal, ó se infunde dentro del útero de una vaca seropositiva en época del servicio (Whitmore *et al.*, 1981).

A partir del día 45, cuando culmina la etapa embrionaria, y hasta el día 125, cuando el feto adquiere competencia inmunológica, la infección por el vDVB NCP puede

provocar el desarrollo de un bovino PI, ya que el sistema inmune inmaduro no reconoce como extraño al virus NCP, y el animal será inmunotolerante a ese virus (Mc Clurkin *et al.*, 1984). La inmunotolerancia es altamente específica, por lo que el animal puede generar una respuesta inmune frente a superinfecciones con vDVB antigénicamente diferentes (Brownlie, 1990 b). No existe evidencia que el biotipo CP del vDVB puede ocasionar infecciones persistentes (Brownlie *et al.*, 1989). Estos PI pueden nacer normales y vigorosos, y son los que eliminan continuamente virus por todas las secreciones, manteniéndolo dentro del ambiente (Dufell y Harkness, 1985; Baker, 1987).

Durante este período también se puede producir muerte fetal, seguida de aborto o momificación, y un pequeño porcentaje de teratogénesis (Baker, 1987; Dubovi, 1994; Moennig y Liess, 1995). La expulsión del feto puede ocurrir muchos meses después de la infección (Baker, 1987).

A partir del día 125 de gestación, en que el feto comienza a tener competencia inmunológica y hasta el día 175, en que se producen los estadios finales de la organogénesis del sistema nervioso, la infección por el vDVB produce el mayor porcentaje de alteraciones del desarrollo. También en esta etapa pueden producirse abortos, pero en menor porcentaje a los que se producen en las etapas tempranas de la gestación. Las malformaciones observadas, de distintos tipos y grados, incluyen: microencefalia, hipoplasia cerebelar, hidranencefalia, hidrocefalia, hipomielogénesis, cataratas, degeneración retiniana, neuritis del nervio óptico, microftalmia, aplasia e hipoplasia del timo, hipotricosis, alopecia, braquignatismo, retardo en el crecimiento, hipoplasia pulmonar y deformidades esqueléticas (Done *et al.*, 1980; Baker, 1987).

Estas malformaciones pueden producirse por daño celular directo del virus a las células madre (Dufell y Harkness, 1985) o la destrucción de las células infectadas por el sistema inmune fetal. Además el virus puede ocasionar daño de glándulas endocrinas, provocando alteraciones en el metabolismo hormonal de los fetos (Dubovi, 1994; Moennig y Liess, 1995).

A partir de los 175 días de gestación, el feto se encuentra en un período de crecimiento general, es inmunológicamente competente, y si se infecta en este período, nace un ternero seropositivo normal o débil. Los abortos son ocasionales (Dubovi, 1994; Moennig y Liess, 1995). Para detectar esta respuesta, el suero debe ser tomado antes de la ingestión de calostro (Baker, 1987).

II.4.4.3. Enfermedad de las mucosas

Es un síndrome inevitablemente fatal, con signos clínicos severos de fiebre, depresión, lesiones orales erosivas, hipersalivación y diarrea acuosa profusa (Baker, 1987; Radostits y Littlejohns, 1988). Únicamente los bovinos que son persistentemente infectados pueden padecerla y en ellos se aíslan ambos biotipos del virus (Brownlie *et al.*, 1984; Bolin *et al.*, 1985). La enfermedad es producida sólo cuando el biotipo CP del virus es antigénicamente similar al biotipo NCP persistente (Brownlie *et al.*, 1986; Baker, 1987; Brownlie, 1990 b). Esta similitud fue demostrada (Corapi *et al.*, 1988). Sin embargo, algunas diferencias entre los biotipos NCP y CP de los pares aislados fueron encontradas por Ridpath *et al.* (1991), pudiendo ser homólogos o heterólogos a nivel genómico y antigénico. Incluso la similitud antigénica no apareció correlacionada

con las características genómicas. Estas diferencias que fueron observadas no afectaron la habilidad del par de virus para producir la EM. Fritzeimer *et al.* (1997) inocularon experimentalmente bovinos PI con cepas CP, y luego de analizar los pares de virus encontrados en cada animal, antigénicamente con anticuerpos monoclonales y genéticamente a través de PCR, concluyeron que las cepas CP idénticas a las NCP persistentes causaban un cuadro precoz de EM, mientras que aquellas cepas CP que eran diferentes, formadas por recombinaciones entre ambos biotipos presentes en el mismo animal, producían enfermedad después de meses de la superinfección. Más recientemente, fue postulado otro mecanismo patogénico de aparición de la cepa CP. Un bovino PI con la cepa no citopática KS86-1 NCP, fue expuesto a la cepa citopática Nose, antigénicamente diferente, desarrolló EM, y de él se aisló la cepa citopática KS86-1 CP. Esta cepa surgió como un virus quimérico, homólogo al biotipo NCP persistente, generado por recombinación entre este y un biotipo CP diferente antigénicamente (Nagai *et al.*, 2003).

Debido a la similitud de la cepa superinfectante con el biotipo NCP persistente, el sistema inmune no la reconoce como extraña, y debido a esto no puede proteger al animal de la enfermedad severa (Brownlie, 1990 b). La infección con el virus CP causa las lesiones observadas en bovinos con EM. La muerte se produce dentro de los 10 días del comienzo de los signos clínicos, sin embargo, los animales con EM crónica pueden sobrevivir por más de 18 meses, con diarrea continua o intermitente y emaciación progresiva (Baker, 1987).

II.5. Lesiones producidas por la infección con el vDVB

II.5.1. Lesiones Macroscópicas

Las lesiones observadas más frecuentemente son las del tracto digestivo superior o las intestinales, aunque varían considerablemente, sobre todo en la enfermedad aguda. En la enfermedad crónica con frecuencia se presenta un panorama patológico más amplio y con lesiones más constantes, aunque a veces resulta oscurecido en parte por la curación o la evolución de las lesiones (Liebler-Tenorio *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2007).

En el morro, las narinas, el borde anterior del labio inferior y su unión cutánea pueden observarse costras, erosiones y úlceras planas. Se ha visto pérdida de epitelio en gran parte de la cavidad oral, sobre todo el paladar, la punta de las papilas bucales y las encías. Muchas de éstas lesiones son úlceras que dejan expuesta la lámina propia intensamente hiperémica, especialmente en las papilas y la faringe. Pueden observarse lesiones en todas las superficies de la lengua, sobre todo en la parte anterior del dorso, donde muchas veces el epitelio degenerado se encuentra adherido, desarrollando grietas o úlceras. Otros sitios de la cavidad oral afectados pueden ser el rodete coronario y la parte interna de las mejillas (Baker, 1987; Wilhelmsen *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 2007).

Generalmente el tercio anterior del esófago presenta erosiones más o menos lineales, con hilachas de epitelio necrótico adherente, que en casos más avanzados se ulceran. En los afectados crónicamente éstas úlceras aparecen como placas elevadas amarillo-

blanquecinas en la periferia de la mucosa lesionada (Liebler-Tenorio *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2007).

Se pueden encontrar lesiones en rumen, retículo y omaso, pero no en el surco esofágico. Estas son parecidas a las lesiones del tracto superior, observándose mejor en los pilares y en porciones de la mucosa que no tengan papilas y sean lisas. En el abomaso, los cambios se presentan regularmente, con ulceraciones que varían desde muy pequeñas hasta medir 1 cm o más de diámetro (Murphy *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2007).

La mucosa del intestino delgado puede observarse frecuentemente normal en la mayor parte de su longitud, aunque se ha encontrado hiperemia difusa y cilindros fibrinosos en la luz. La pared puede estar muy engrosada por el edema en la submucosa y la subserosa. En los casos agudos, una lesión bastante característica ha sido la presencia de sangre coagulada y fibrina contorneando a la cubierta erosionada de las placas de Peyer. Las placas se pudieron ver desde la serosa como áreas ovales rojo-negruzcas de 10 a 12 cm de largo en el borde opuesto al mesenterio. Las afectadas en forma menos aguda se han visto recubiertas por una membrana diftérica, y en los casos más leves o crónicos, deprimidas y cubiertas por un mucus pegajoso. A veces, éstas placas semejan úlceras. Los nódulos linfáticos mesentéricos por lo general no se presentan agrandados. En el intestino grueso, las lesiones son muy variables. La mucosa se puede hallar congestiva, con un diseño atigrado, siguiendo los pliegues, y en los casos agudos se ha podido ver una tiflocolitis fibrinohemorrágica. En casos más crónicos se han observado lesiones fibrinosas o fibrinonecróticas y ulceración focal o

extensa a cualquier nivel, sobre todo en ciego y recto (Wilhelmsen *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 2007).

Puede observarse coronitis extendida completamente alrededor de la banda coronaria, con separación de la unión piel-cuerno y un crecimiento excesivo del cuerno, así como dermatitis desde la corona hacia arriba por la cuartilla. También se ha encontrado dermatitis exudativa generalizada, con lesiones más costrosas desde la nariz, orejas y párpados hasta la cruz. En muchos animales las lesiones costrosas son más severas en axilas, ingle y periné (Baker, 1987; Odeón *et al.*, 2003).

Si bien el virus afecta primariamente al tubo digestivo, también presenta una gran afinidad por el tejido linforreticular, ocasionando focos de necrosis en los linfonódulos del bazo y destrucción de las placas de Peyer del intestino delgado y atrofia del tejido linfático en general (Frederiksen *et al.*, 1999 a y b; Wilhelmsen *et al.*, 1991; Liebler-Tenorio *et al.*, 1997; Liebler-Tenorio *et al.*, 2000).

Algunos animales con infección crónica han desarrollado infecciones micóticas secundarias a las lesiones de los preestómagos, abomaso y placas de Peyer (Brown *et al.*, 2007).

En animales persistentemente infectados, donde se aisló el genotipo 1b del vDVB y *Mycoplasma* o *Mannheimia haemolytica*, se observaron lesiones de pleuroneumonía aguda, severa, con hemorragias y necrosis multifocales (Fulton *et al.*, 2002).

En las fases tempranas de la enfermedad de las mucosas, se hallaron erosiones leves a moderadas en la cavidad oral, esófago y abomaso, Placas de Peyer cubiertas de fibrina y reducción del tamaño del timo (Liebler-Tenorio *et al.*, 1997). Otros autores han descrito ulceraciones del espacio interdigital y la banda coronaria, petequias en el

epicardio y en la submucosa del abomaso, enfisema intersticial en los lóbulos pulmonares, adherencias fibrinosas entre la pleura y el pericardio y hemorragias múltiples en la corteza de los linfonódulos pre-escapulares y poplíteos (Odeón *et al.*, 2003).

Las lesiones macroscópicas encontradas en animales infectados con el genotipo II del vDVB fueron congestión generalizada de las mucosas, ulceraciones profundas y extensas en la lengua, paladar y esófago, congestión en la mucosa ruminal y omasal, con múltiples focos blanco-amarillentos difusamente distribuidos en la mucosa del omaso. También se hallaron áreas diseminadas de congestión y ulceración en el intestino delgado, cubiertas con fibrina y hemorragias petequiales en el epicardio y miocardio. Otros autores han descrito neumonía (Carman *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2000). Ellis *et al.* (1998) también han encontrado lesiones importantes de neumonía afectando hasta el 25% de los pulmones, y en contraste, lesiones mínimas en el tracto gastrointestinal. Stoffregen *et al.* (2000) han considerado que las lesiones morfológicas observadas en los síndromes hemorrágicos producidos por el genotipo II del vDVB, si bien muestran algún parecido con las lesiones de enfermedad de las mucosas, pueden ser diferenciadas, porque en el síndrome hemorrágico las hemorragias no están asociadas a severas erosiones y ulceraciones.

En los brotes de enteritis aguda ocasionados por el genotipo II del vDVB, descritos por Odeón *et al.* (2003), el abomaso, el intestino delgado y el ciego se hallaron llenos de un contenido pastoso y hemorrágico. La mucosa del abomaso presentó erosiones ovals múltiples, y la superficie de corte de las paredes de los órganos se observó edematosa. La mucosa del ileon presentó coágulos de sangre, de 4 a 7 cm. de diámetro,

adheridos a las placas de Peyer. Secciones extensas de la mucosa del intestino delgado presentaba una coloración rojo-oscura. El hígado y la grasa perirrenal se encontraron ictéricos. También se encontraron hemorragias de 4 a 5 cm en el endocardio de los ventrículos izquierdo y derecho del corazón y la superficie de corte de los ganglios linfáticos se presentó hemorrágica.

II.5.2. Lesiones Microscópicas

Las lesiones más importantes fueron halladas en el tracto gastrointestinal y en los órganos linfáticos, por la afinidad que tiene el virus por los tejidos epitelial y linfoide (Baker, 1987).

Brown *et al.* (2007) observaron que las lesiones del aparato digestivo anterior comienzan con necrosis del epitelio. Las células profundas del epitelio, se presentaron tumefactas, con núcleos picnóticos individualmente o en grupos. Estos focos se fueron agrandando progresivamente y formando grandes áreas de necrosis que se extendieron hasta la capa basal. En las etapas tempranas se observó poca o ninguna inflamación en la lámina propia, pero los leucocitos se observaron invadiendo el epitelio necrótico, y luego se desarrolló la reacción inflamatoria con capilares congestionados, linfáticos dilatados y exudado inflamatorio leucocitario.

En el abomaso se ha observado necrosis epitelial, principalmente en las profundidades de las glándulas, que se hallaron dilatadas con restos epiteliales y leucocitos contenidos en su interior. En algunos lugares el epitelio se tornó cuboidal, basofílico y aparentemente secretor de mucus. En la submucosa se han encontrado

exudados seroso y leucocitario, y algunas hemorragias. Se observaron algunos focos necróticos glandulares, relacionados con necrosis en los nódulos linfoides adyacentes a la mucosa (Brown *et al.*, 2007).

La lesión característica de la mucosa intestinal ha sido la destrucción del revestimiento epitelial de las criptas de Lieberkühn. Se han observado glándulas severamente afectadas en las porciones más bajas del intestino delgado, en el ciego y el colon. Generalmente se han visto dilatadas y llenas de mucus, con restos epiteliales y leucocitos (Wilhelmsen *et al.*, 1991; Khodakaram-Tafti y Miller, 2006; Brown *et al.*, 2007).

Las lesiones microscópicas de las placas de Peyer se han considerado características, siendo comparables a las lesiones provocadas por la Peste bovina. En la fase aguda, la inflamación aguda severa de la mucosa sobre las placas, se ha visto relacionada con la destrucción de las glándulas, el colapso de la lámina propia y la lisis del tejido linfoides folicular. Más tarde se han observado las criptas dilatadas, revestidas por epitelio cuboidal, llenas de restos necróticos y células inflamatorias, haciendo hernia hacia la submucosa (Wilhelmsen *et al.*, 1991; Khodakaram-Tafti y Miller, 2006; Brown *et al.*, 2007). La apariencia macro y microscópica de las placas de Peyer ha aportado evidencia útil para el diagnóstico. En los casos crónicos de enfermedad de las mucosas, las placas de Peyer mostraron una pérdida total de la arquitectura (Wilhelmsen *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 2007).

Una lesión microscópica importante que se ha observado fue la degeneración hialina y necrosis fibrinoide de las arteriolas submucosas y mesentéricas (Khodakaram-Tafti y Miller, 2006; Al-Afaleq *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2007). En las paredes de los vasos y

en áreas perivasculares, se presentó una reacción inflamatoria mononuclear leve a moderada. Estas lesiones se han podido encontrar también en otros órganos, como corazón, cerebro y corteza adrenal (Brown *et al.*, 2007). Liebler-Tenorio *et al.* (2000) sólo encontraron lesiones vasculares en bovinos que desarrollaron la enfermedad de las mucosas tardía y no en los que lo hicieron tempranamente. Estas lesiones estaban caracterizadas por necrosis segmental de las paredes vasculares e infiltración perivascular linfocítica en arteriolas y pequeñas arterias de la submucosa del intestino.

Microscópicamente, los nódulos linfáticos mesentéricos muestran una población linfocitaria disminuída y necrosis de los centros germinales (Baker, 1987; Wilhelmsen *et al.*, 1991; Liebler-Tenorio *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2007).

En los cortes de piel, se encontraron acumulaciones focales de epitelio necrótico, con hiperemia extensa de la dermis subyacente. Las lesiones epiteliales encontradas fueron similares a las de la mucosa escamosa del tracto alimentario superior. La necrosis se extendió profundamente a través de la capa basal, conduciendo a ulceraciones, que fueron más comunes en las zonas del periné y cara interna de los miembros. En los afectados crónicamente se pudo encontrar hiperplasia basal de la piel. En los brotes de dermatitis generalizada descritos por Odeón *et al.* (2003), las lesiones observadas fueron hiperqueratosis ó paraqueratosis, con células necróticas aisladas o agrupadas, y células mononucleares asociadas a los vasos sanguíneos. Los senos subcapsulares y trabeculares de los ganglios mesentéricos contenían moderadas cantidades de neutrófilos, con necrosis de linfocitos individuales dentro de los folículos

primarios. En la pulpa blanca del bazo también se halló moderado número de neutrófilos (Odeón *et al.*, 2003).

Lesiones consistentes en otros tejidos incluyeron presencia de múltiples focos de linfocitos, plasmocitos y eosinófilos en corteza renal, adrenal, tríadas portales y submucosa de la vesícula biliar (Brown *et al.*, 2007).

Grooms *et al.* (1998 a) observaron ooforitis crónica linfocítica en hembras bovinas infectadas en forma aguda con el vDVB.

En los infectados persistentes, se describieron lesiones microscópicas en riñón y cerebro. Las lesiones renales consistieron en un engrosamiento difuso y focal de las membranas basales de los glomérulos, con aumento de las células mesangiales. Las pruebas de anticuerpos fluorescentes demostraron el antígeno en los glomérulos, células epiteliales de los túbulos contorneados y células endoteliales de los vasos intersticiales. Las lesiones glomerulares probablemente se hayan producido por el depósito de complejos antígeno-anticuerpo. Estos antígenos también fueron encontrados en las neuronas, sobre todo de la corteza cerebral. Las neuronas presentaron picnosis y se observó satelitosis por astrocitos y linfocitos. Unos pocos vasos estaban rodeados por linfocitos y poseen células endoteliales hipertróficas. Los cambios neuronales probablemente se produjeron por la acción directa del virus (Cutlip *et al.*, 1980). Liebler-Tenorio *et al.* (1997) han hallado lesiones de bronconeumonía y erosiones leves en cavidad oral y esófago. En contraste, Bielefeldt Ohmann (1988 b) ha demostrado que en algunos animales infectados persistentes, clínicamente sanos, no existen evidencias de lesiones patológicas o reacciones inflamatorias en tejidos salvo algunos infiltrados

intersticiales pequeños de células mononucleares en riñones, tríadas portales y músculos.

Las lesiones microscópicas halladas en brotes de enfermedad de las mucosas revelaron hemorragias, depleción y linfocitólisis en los folículos linfáticos de linfonódulos periféricos. Se observó también histiocitosis medular y depleción linfoidea en linfonódulos gástricos y mesentéricos. En los estratos basal y espinoso del epitelio lingual y del esófago se encontró vacuolización y necrosis celular y por debajo de las lesiones, escasa inflamación no supurativa. En el intestino delgado se halló degeneración y necrosis de las criptas, con grandes cantidades de restos celulares en ellas. En pulmones se observó moderada congestión y reacción intersticial, con infiltración linfocítica y en las áreas de enfisema, hemorragias y coágulos de fibrina dentro de los alvéolos (Odeón *et al.*, 2003).

Wilhelmsen *et al.* (1991) examinaron tejidos de tres grupos de terneros: con enfermedad de las mucosas experimentalmente inducida, con enfermedad de las mucosas adquirida naturalmente, y con enfermedad crónica de las mucosas adquirida naturalmente. En todos los grupos las lesiones microscópicas en el tracto gastrointestinal y en el sistema linfoide fueron severas. Se observó una enteritis eosinofílica con glándulas quísticas y abscesos en las criptas. Las células de los ganglios mientéricos tenían vacuolización citoplasmática periférica. Algunos bovinos presentaron arteritis y periarteritis con necrosis fibrinoide. Las células del tracto alimentario superior presentaban vacuolización y necrosis. Los tejidos linfoides tenían una depleción linfocitaria marcada o necrosis o contenían un pequeño número de folículos indiferenciados sin centros germinales. Lesiones consistentes en otros tejidos

fueron múltiples focos de linfocitos, plasmocitos y eosinófilos en corteza renal y adrenal, tríadas portales y submucosa de la vesícula biliar.

Las lesiones microscópicas observadas en animales infectados con el genotipo II fueron ulceraciones profundas a través de la mucosa del tracto digestivo, infiltrados de células polimorfonucleares en la mucosa de la lengua y esófago, focos de necrosis en el rumen, con infiltrados poli y mononucleares en la mucosa y submucosa, focos de necrosis en el límite entre el retículo y el omaso. También se observó necrosis y ulceración en la mucosa del intestino delgado, con infiltrados polimorfonucleares y linfocíticos. Los vasos sanguíneos de la submucosa presentaron necrosis fibrinoide (Flores *et al.*, 2000). En los brotes de enteritis aguda, provocados por el genotipo II del vDVB, las lesiones microscópicas se correspondieron con las macroscópicas: se encontró masiva degeneración y necrosis del epitelio de la lengua con reacción mononuclear, necrosis de células individuales en el epitelio del rumen y reacción inflamatoria moderada en la lámina propia del intestino delgado, con hemorragias. También se encontró necrosis linfoidea en los folículos primarios del bazo (Odeón *et al.*, 2003). Blas-Machado *et al.* (2004) encontraron lesiones de meningoencefalitis multifocal, con degeneración neuronal, necrosis y gliosis en una vaquillona, provocadas por el genotipo II del vDVB.

II.5.3. Lesiones macro y microscópicas en fetos

El aborto ha sido producido en la etapa febril aguda o en convalecencia, y en el feto se han podido observar las lesiones entéricas de la enfermedad. Se han encontrado

hemorragias puntiformes con úlceras de 1 a 3 mm de diámetro en la cavidad oral, el esófago, laringe, tráquea, conjuntiva y abomaso. Las lesiones fetales del epitelio escamoso evolucionaron de la misma manera que las descritas antes, con hemorragias focales en la lámina propia y necrosis epitelial comenzando en la capa basal (Brown *et al.*, 2007).

Las inoculaciones experimentales en hembras gestantes han permitido observar en los fetos lesiones del desarrollo, tales como: hipoplasia tímica, causada por necrosis y depleción linfocitaria, lesiones en cerebelo y piel (Bielefeldt Ohmann, 1982; Baker, 1987). Yeruham *et al.* (2001), han descrito un caso inusual de malformación congénita en un ternero nacido después de una gestación prolongada, que murió a los 15 minutos de nacido, con una serie de anomalías: presencia de los dos globos oculares dentro de una sola cavidad orbitaria, hemisferios cerebrales y nervios ópticos fusionados, hidrocefalia, ausencia de glándula hipófisis y alopecia generalizada.

Murray (1991) describió lesiones fetales en párpados, caracterizadas por congestión, edema e infiltración de células inflamatorias mononucleares en el tejido conjuntivo subconjuntival y conjuntivitis bilateral. En pulmones, corazón e hígado encontró infiltrados inflamatorios mononucleares.

II.6. Diagnóstico

No existen signos clínicos patognomónicos de la infección por vDVB. Por lo tanto, las investigaciones diagnósticas dependen del laboratorio para la detección de los anticuerpos inducidos por el virus en las muestras obtenidas, o la detección del virus o

sus componentes. La técnica de RT-PCR permite detectar el ácido nucleico viral, y las técnicas inmunoquímicas que utilizan anticuerpos monoclonales y policlonales permiten reconocer diversas proteínas virales (Sandvik, 1999).

Si bien el vDVB no está entre los virus más frágiles, la obtención de resultados confiables depende de la toma de muestras apropiadas, así como también de la conservación y transporte de las mismas hasta llegar al laboratorio (Baker, 1987).

II.6.1. Detección del virus por Aislamiento viral

Es el método de referencia, altamente sensible y 100% específico. Permanece siendo la técnica “gold standard”, frente a la cual las nuevas técnicas deben ser comparadas (Murphy *et al.*, 1999). El virus puede replicarse en muchos tipos diferentes de cultivos celulares. Entre los más sensibles están los cultivos de bajo pasaje de células de riñón bovino (Purchio *et al.*, 1983), células de los cornetes nasales y células de testículo (Edwards, 1990). El suero fetal bovino usado como suplemento en el medio del cultivo celular debe ser libre del virus y de anticuerpos específicos contra él (Sandvik, 1999).

Para aislar el virus pueden utilizarse muestras de sangre, que permiten realizar el diagnóstico ante-mortem, tanto de animales PI que son siempre virémicos, como de animales infectados en forma aguda que en ese momento estén con viremia, aproximadamente a los 4 a 8 días post-infección. En este último caso, resulta más frecuente aislar el virus a partir de leucocitos sanguíneos más que del suero (Baker, 1987; Goens, 2002). El aislamiento también puede realizarse a partir de órganos de

animales adultos o fetos, tomados durante la necropsia, tales como bazo, hígado, pulmón o riñones (Murphy *et. al.*, 1999). Las secreciones nasales y heces son importantes fuentes de infección para otros animales, pero pueden estar contaminadas con otros microorganismos y sustancias tóxicas para los cultivos celulares. Para la verificación virológica de la enfermedad de las mucosas, la cepa citopatogénica de vDVB puede ser aislada de lesiones en el intestino delgado o de las placas de Peyer del ileon. Las muestras de órganos deben ser recolectadas asépticamente y transportadas rápidamente al laboratorio refrigeradas. El virus no se destruye por el congelamiento, pero si las muestras son congeladas se debe evitar el descongelamiento durante el transporte (Sandvik, 1999).

El aislamiento viral es la única técnica que permite determinar el biotipo de virus actuante, de acuerdo al efecto que produce el crecimiento viral sobre las células cultivadas (Goens, 2002). Como las células infectadas con biotipos no citopáticos no pueden ser distinguidas de los controles no infectados, los cultivos celulares son usualmente fijados e incubados con fluorocromo o enzimas marcadas con anticuerpos específicos contra vDVB. Para identificar los biotipos citopáticos, los cultivos celulares se examinan a diario para observar el efecto citopatogénico sobre las células. Si se presenta en bajo título, pueden observarse focos de células lisadas con el microscopio de contraste de fases, y si las células son fijadas en la fase de infección, los antígenos virales pueden verse en la periferia de los focos. Por otra parte, el virus citopático puede ser identificado como vDVB por neutralización con anticuerpos específicos (Sandvik, 1999).

Para la detección de vDVB en gran número de muestras de suero, sobre todo para detectar PI con menores costos, se ha desarrollado y aplicado una técnica de aislamiento viral en microplacas, con 96 pocillos donde se inoculan 10-50 ul de cada una de las muestras de suero, y los resultados pueden leerse en 4 días. Para detectar el virus aislado se realizó la inmunomarcación de las monocapas de células con anticuerpos monoclonales. Para ello, se utilizaron dos técnicas: la prueba de inmunoperoxidasa en monocapa, que produjo un precipitado rojo que puede verse a simple vista o con microscopio de luz, o un ELISA en monocapa, que produjo un color amarillo en solución. La intensidad de color en esta última se midió con espectrofotómetro (Saliki *et al.*, 1997).

A pesar de ser altamente específica, los anticuerpos calostrales pueden reducir temporariamente la cantidad de virus libre en el suero de terneros jóvenes, por eso en terneros PI que recibieron pasivamente suficiente cantidad de anticuerpos contra vDVB a través del calostro, el virus puede no detectarse en el suero o la sangre entera por aislamiento viral (Baker, 1987; Brock *et al.*, 1998; Zimmer *et al.*, 2004).

II.6.2. Detección del ácido nucleico viral

La técnica de RT-PCR ha permitido diferenciar los dos genotipos de vDVB existentes (Ridpath *et al.*, 1994), aunque actualmente el genotipo I y el II también pueden diferenciarse a través de anticuerpos monoclonales que se utilizan luego del aislamiento viral en microplacas (Deregt y Prins, 1998). Han sido publicados numerosos trabajos sobre el uso de la técnica de RT-PCR para amplificar el genoma

viral (Thür y Hofmann, 1998; Ridpath y Bolin, 1998; Bolin y Ridpath, 1998; Flores *et al.*, 2000; Ridpath *et al.*, 2000; Ridpath y Neill, 2000; Kümmerer y Meyers, 2000; Vilcek *et al.*, 2000; Neill y Ridpath, 2001; Becher *et al.*, 2001; Swasdipan *et al.*, 2001; Ridpath *et al.*, 2002; Odeón *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2003; Givens *et al.*, 2004; Cornish *et al.*, 2005; Meyers *et al.*, 2007). La RT-PCR es un método rápido, sensible, específico, que detecta diversos vDVB y permite investigar un gran número de muestras en corto tiempo. Debido a la secuencia de nucleótidos muy conservada en la región cercana a 5', esta técnica ofrece gran sensibilidad epidemiológica (Sandvik, 1999). Sin embargo, Vilcek *et al.* (2001) encontraron que el genotipo I del vDVB puede ser separado en por lo menos 11 genogrupos, por lo que han recomendado que los primers que se utilizan en la RT-PCR sean cuidadosamente examinados para asegurar la amplificación de todos los genogrupos de vDVB. Esta prueba puede usarse para muchas categorías de muestras, que incluyen sangre de infectados persistentes donde el virus fue neutralizado por anticuerpos maternos (Zimmer *et al.*, 2004) y sangre de animales con infección aguda así como también muestras provenientes de cultivos celulares. Otro uso importante de la RT-PCR es el monitoreo de cultivos celulares y suero fetal bovino usado como suplemento en los cultivos celulares, los cuales pueden estar contaminados con cepas no citopáticas de vDVB (Sandvik, 1999). Puede también utilizarse para investigar pools de suero o leche de tanque para identificar animales infectados persistentes en un rodeo o en un subgrupo del rodeo (Deregt y Loewen, 1995; Muñoz-Zanzi *et al.*, 2000).

II.6.3. Detección de antígenos virales

Los anticuerpos monoclonales se han transformado en una de las herramientas para analizar detalladamente a los pestivirus. Los anticuerpos han sido caracterizados con respecto a su espectro de reactividad con diferentes cepas y aislamientos, la capacidad de neutralizar a los virus y su especificidad proteica (Collett *et al.*, 1989). La preparación de los primeros anticuerpos contra vDVB fue publicada por Peters *et al.* (1986).

II.6.3.1. Detección de antígenos mediante el Método de Elisa de Captura de Antígenos

A través del uso de anticuerpos poli o monoclonales dirigidos contra proteínas específicas del vDVB, pueden detectarse antígenos virales en diversos tipos de muestras. La técnica de ELISA de captura de antígenos, permite detectar antígenos en muestras de suero (Thur *et al.*, 1998; Reinhardt *et al.*, 2003) o tejidos que pueden ser tomados a través de biopsias, por ejemplo piel de oreja, para detectar PI (Braun *et al.*, 1999; Cornish *et al.*, 2005). Comparado con el aislamiento viral, es un método rápido y económico, por lo tanto, es el método de preferencia para la detección a gran escala de PI (Dubovi, 1996). Al igual que el aislamiento viral, el ELISA puede dar falsos negativos en terneros PI que han ingerido suficiente cantidad de calostro (Zimmer *et al.*, 2004).

II.6.3.2. Detección de antígenos mediante Inmunohistoquímica

La IHQ permite la detección de antígenos en secciones de tejidos a través del uso de anticuerpos específicos marcados que se unen a ellos, generando una tinción microscópicamente visible en el sitio de la unión. Hasta hace poco tiempo, la mayoría de las tinciones inmunohistoquímicas usaban anticuerpos unidos a fluoresceína, que se aplicaban sobre muestras de tejidos frescas o congeladas, y producían una tinción débil que era visible sólo a través de un microscopio de luz ultravioleta (Haines y Chelack, 1991). Ward y Kaeberle (1984) evaluaron el uso de anticuerpos unidos a peroxidasa para la detección del vDVB en cultivos celulares, usando microscopio de luz y electrónico, con buenos resultados. Katz *et al.* (1987) desarrollaron una técnica de inmunoperoxidasa para identificar cultivos celulares infectados con el virus, y aquellas monocapas de células infectadas se tiñeron intensamente, mientras que las no infectadas permanecieron sin tinción, permitiendo detectar los cultivos infectados con observación a simple vista.

Belák *et al.* (1989) detectaron antígenos de vDVB en cultivos celulares y secciones de tejido fijadas con alcohol y embebidas en parafina, utilizando la técnica de peroxidasa-antiperoxidasa, con anticuerpos monoclonales. Allan *et al.* (1989) han detectado antígenos del vDVB en secciones de órganos de casos de enfermedad de las mucosas y de animales infectados persistentes fijados con formol y embebidos en parafina. Para ello, realizaron predigestión de las secciones con proteasa XIV al 0,02%, durante 18 horas a 4° para desenmascarar los antígenos que pueden ser afectados por la fijación con formol, y luego incubaron con anticuerpos monoclonales. La tinción fue considerablemente más intensa en tejidos de casos de enfermedad de las mucosas que en

aquellos de animales virémicos persistentes, reflejando una predominancia de la cepa citopática del virus en la enfermedad de las mucosas, la cual se tiñe más intensamente que la cepa no citopática de vDVB en cultivos celulares.

La aplicación de la IHQ como técnica de rutina en el diagnóstico de vDVB se enfrenta a la dificultad principal de la calidad del material que llega al laboratorio y al posterior procesamiento de las muestras. La calidad de los resultados depende básicamente de la fijación y procesamiento de los tejidos, desenmascaramiento de epitopes, sensibilidad de los sistemas de detección y calidad de los anticuerpos (Werner, 1999).

A fin de hacer frente a estas dificultades ocasionadas por la sobrefijación, se han desarrollado numerosos métodos de recuperación antigénica, basados en procedimientos físicos (microondas, ebullición, ultrasonido), químicos (digestión enzimática) o la combinación de ambos, con la finalidad de poner en evidencia los antígenos enmascarados por la fijación (Gimeno *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2001).

Wilhelmsen *et al.* (1991) identificaron el antígeno viral intracitoplasmático por inmunohistoquímica en células de los ganglios mientéricos, en células de las criptas, en el tejido linfático asociado al intestino, y mononucleares de los nódulos linfáticos mesentéricos. Los virus citopáticos y no citopáticos fueron aislados del bazo de los tres animales que murieron.

Liebler-Tenorio *et al.* (1997) estudiaron el desarrollo de las lesiones de la enfermedad de las mucosas y la diseminación de la cepa citopática del vDVB a diferentes órganos, relacionándolas con el tiempo de post-inoculación. La enfermedad de las mucosas se indujo en 15 bovinos infectados persistentes de 2 rodeos, con la

inoculación intranasal de la cepa citopática homóloga. El antígeno de las cepas citopáticas se detectó selectivamente en secciones de tejido mediante la inmunohistoquímica. En la fase temprana, había cantidades variables de vDVB citopático, más consistentemente en las tonsilas, nódulos linfáticos, placas de Peyer y nódulos linfáticos del intestino grueso. En el tejido linfático, primero unas pocas células contenían el antígeno, y luego los grupos de folículos linfáticos. En el epitelio intestinal, el antígeno del vDVB se encontró focalmente en las etapas tempranas de la enfermedad. La distribución difusa en la fase tardía se correspondió con los signos clínicos de diarrea.

Shin y Acland (2001) estudiaron la distribución tisular y la localización celular de antígenos virales en animales persistentemente infectados por el virus con aislamiento viral e inmunohistoquímica. La cepa no citopática de DVB fue aislada de un pool de tejidos de hígado, riñones y bazo. La inmunohistoquímica detectó antígenos virales en células epiteliales y no epiteliales del tracto gastrointestinal, hígado, páncreas, pulmones, órganos linfáticos (bazo y nódulos linfáticos), adrenales, útero y glándula mamaria. Por estos hallazgos, los autores concluyeron que los animales infectados persistentes diseminan virus a través de todas las vías, y la infertilidad asociada a DVB está relacionada con la presencia del virus en ovario y útero.

Grooms y Keilen (2002) evaluaron el uso de la inmunohistoquímica sobre biopsias de piel de terneros neonatos como un método para detectar tempranamente los infectados persistentes, comparando los resultados con el aislamiento viral y concluyeron que es una herramienta que puede utilizarse para el control y la erradicación de la infección.

Fredriksen *et al.* (1999 a) investigaron la distribución tisular y la localización celular de antígeno del virus en el útero, los placentomas, las membranas fetales intercotiledonarias y los órganos fetales de vaquillonas preñadas y no preñadas persistentemente infectadas por técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales y hubo reactividad en todos los órganos examinados tanto en células epiteliales como no epiteliales. Parece ser que la preñez favorece la reproducción de los virus en el útero, y por eso en los órganos de las vaquillas preñadas hubo tinción más intensa y una mayor proporción de células positivas al antígeno viral que en los órganos de las vaquillas no preñadas.

Swasdipan *et al.* (2001) investigaron la infección fetal y la distribución del virus en los tejidos fetales y en el útero de ovejas en la preñez temprana, luego de la infección experimental de las mismas por una ruta natural, como es la intranasal. Las muestras se examinaron histológicamente, se realizó RT-PCR e IHQ. A pesar de no observarse cambios histopatológicos en los tejidos fetales y maternos, el virus fue detectado en el tracto reproductivo de todos los animales examinados, así como también en los fetos. Los autores concluyen que el virus puede diseminarse desde el sitio de infección natural a los fetos dentro de los 4 días en ausencia de inmunidad materna y a pesar de la presencia de interferón en el tracto reproductivo.

En un estudio de Fredriksen *et al.* (1999 b), el estadio más temprano de infección en el cual los antígenos del virus pudieron ser detectados en los tejidos fetales fue a los 14 días post infección. En este estadio, el antígeno del virus fue detectado en células de origen mesenquimático en los pulmones y en grandes células que morfológicamente recordaban megacariocitos inmaduros en el hígado. Los resultados obtenidos indican

que la infección fetal con DVB puede tener lugar sin altas concentraciones anteriores o simultáneas de virus en útero o placenta de vaquillonas infectadas en forma aguda.

Blas Machado *et al.* (2004) estudiaron el caso de una vaquillona con signos nerviosos, a la que se aisló el biotipo no citopático del genotipo II del vDVB, y microscópicamente se encontraron lesiones de encefalitis. Por IHQ detectaron antígenos de vDVB en el citoplasma de las neuronas, células gliales, epitelio del epéndimo, macrófagos perivasculares y células del músculo liso y monocitos intravasculares del cerebro y tronco encefálico. Este caso fue el primero publicado de lesiones cerebrales y localización del antígeno viral tipo II, y los autores proponen que el vDVB tipo II aislado de este caso puede representar una cepa neurovirulenta del virus.

El antígeno está presente en muchos otros tejidos que no tienen lesiones microscópicas, tales como células endoteliales vasculares de muchos órganos, células mononucleares del bazo, nódulos linfáticos mesentéricos y mediastínicos y células epiteliales de las criptas (Bielefeldt Ohmann, 1982; Fredriksen *et al.*, 1999 a y b; Liebler-Tenorio *et al.*, 2000).

II.6.4. Detección de respuesta inmune contra el vDVB

La respuesta inmune contra un agente infeccioso es clasificada como celular o humoral, y la inmunidad puede ser adquirida activamente por infección o pasivamente por transferencia de anticuerpos calostrales. La inmunidad celular, medida por la proliferación de células mononucleares en sangre periférica después de la exposición in

vitro al vDVB, ha sido demostrada en vacas seropositivas, pero no en terneros que fueron pasivamente inmunizados con anticuerpos calostrales.

Sin embargo, muchos estudios de detección de respuesta inmune contra DVB, se han concentrado en la detección de anticuerpos específicos para el virus. Estos pueden ser detectados en el suero desde tres semanas después de una infección aguda hasta por años en animales inmunocompetentes. Los anticuerpos específicos contra vDVB pueden ser clasificados en 2 grupos funcionales: los anticuerpos contra las glicoproteínas (primariamente E2 o gp 53), que pueden bloquear la infectividad o neutralizar el virus y tienen reacción cruzada entre diferentes cepas de vDVB, y los anticuerpos contra la proteína no estructural altamente inmunogénica NS2-3 (p125), que no neutralizan el virus, pero que está antigénicamente conservada entre todas las especies de pestivirus (Sandvik, 1999).

La seronegatividad combinada con el aislamiento de la cepa citopática es la mejor confirmación de la enfermedad de las mucosas. Idealmente, también debería aislarse el biotipo no citopático, pero a veces los biotipos citopáticos enmascaran a los no citopáticos y éstos sólo serán detectados por técnicas más específicas (Goens, 2002). La seronegatividad con el aislamiento de la no citopática es una buena confirmación de infección persistente. Desafortunadamente, esto no ocurre siempre, porque los PI pueden ser seropositivos. Esto se produce cuando el PI es infectado con una cepa antigénicamente distinta al biotipo no citopático persistente, generando cuasiespecies que generan una respuesta inmune con producción de anticuerpos (Collins *et al.*, 1999). Otra causa de seropositividad en el PI puede ser la ingestión de calostro (Baker, 1987).

II.6.4.1. Seroneutralización viral

Cuando está correctamente calibrada, la neutralización viral es una prueba sensible y específica para detección de anticuerpos contra vDVB, y ha sido largamente reconocida como método de referencia para serología de DVB. En la actualidad, es realizada en 96 placas, donde el suero diluído en forma seriada es incubado con un virus de desafío citopático antes de agregar células bovinas susceptibles. La incubación se realiza durante 4 días. Debido a la alta especificidad de éste test, es esencial usar un virus de desafío antigénicamente similar a los virus de campo de la población que se analiza. Las cepas de referencia más comúnmente usadas son las cepas citopáticas NADL, Singer y Oregon (Edwards, 1990). La prueba requiere inversiones sustanciales en la selección y monitoreo de los cultivos celulares y medios para dar resultados satisfactorios, y por lo tanto, no es indicada para el examen de pocas muestras esporádicas (Sandvik, 1999). Otra desventaja de la seroneutralización es que en animales PI puede dar reacciones falsas positivas por la interferencia que producen los altos niveles de virus no citopático en el suero del animal (Baker, 1987).

II.6.4.2. Enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA indirecto)

El test de ELISA es un método de diagnóstico muy versátil, y para la serología de vDVB se ha vuelto muy popular por varias razones: es independiente de cultivos celulares, puede fácilmente ser aplicada como prueba screening y los resultados pueden ser leídos en pocas horas. La especificidad de este sistema es determinada por la

elección del antígeno viral, que pueden ser partículas víricas purificadas, extractos de cultivos celulares inoculados con el virus, antígenos virales simples inmovilizados con anticuerpos monoclonales, ó proteínas virales recombinadas producidas en bacterias.

Cuando la performance de los ELISA se compara con la prueba de neutralización viral, únicamente aquellos que usan partículas virales purificadas como antígenos pueden dar resultados equivalentes, pero no obstante, ha sido encontrada una concordancia aceptable con el ELISA anti- NS23. Los kits de ELISA están disponibles comercialmente (Sandvik, 1999). Reinhardt *et al* (2001) encontraron mayor sensibilidad del ELISA con respecto a la seroneutralización, para el diagnóstico de anticuerpos anti-vDVB.

II.6.4.3. Otras pruebas serológicas

Muchas técnicas se han adaptado para ser aplicadas en serología de vDVB, incluyendo inmunodifusión en gel de agar, fijación del complemento, inmunofluorescencia indirecta y western blotting. La inmunodifusión en gel de agar detecta primariamente anticuerpos contra el antígeno NS23, pero como la sensibilidad analítica es baja, este se realiza mejor como una simple prueba de screening. Igualmente, la sensibilidad analítica de la fijación de complemento no es muy alta, pero puede ser usada para la detección temprana de anticuerpos en animales con seroconversión, ya que los anticuerpos detectados con ésta prueba aparecen y declinan más temprano que los anticuerpos neutralizantes o precipitantes. El test de inmunofluorescencia indirecta, en el cual las células infectadas por el virus fijadas sobre

un portaobjetos son usadas como antígenos, es similar al ELISA, pero tiene que ser leído manualmente. Sin embargo, es una alternativa a usar cuando haya muchos signos de background con el ELISA. Técnicamente, el western blot es también similar a algunos ELISAs, pero provee información sobre la especificidad molecular de los anticuerpos (Sandvik, 1999).

III- MATERIALES Y MÉTODOS

III- MATERIALES Y METODOS

III.1. Materiales

En la presente investigación fueron procesados 50 fetos bovinos abortados procedentes de tambos de la Cuenca Lechera Santafesina, que llegaron al Hospital de Salud Animal para determinar la causa del aborto, a través de la realización de la necropsia y toma de muestras para aislamiento viral, histopatología e inmunohistoquímica.

III.2. Métodos

Realizada la necropsia, se obtuvieron muestras de los siguientes órganos: hígado, bazo, válvula ileo-cecal, corazón, pulmón, timo, ganglios linfáticos, riñón, adrenal y piel. En algunos casos también se remitieron muestras de otros órganos, de acuerdo a las lesiones macroscópicas observadas. Durante el muestreo, de cada órgano se separó 1 alícuota en recipiente estéril para aislamiento viral y 1 alícuota en frascos de boca ancha, para Histopatología e Inmunohistoquímica, utilizando formol bufferado al 10% como fijador.

III.2.1. Aislamiento viral

El aislamiento viral a partir de las muestras fetales fue realizado en el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Para ello las alícuotas de

órganos recibidos se cortaron finamente con tijera y se trituraron (en pools y separadamente) en un mortero con arena estéril y MEM (Minimum Essential Medium). La suspensión obtenida se centrifugó, se filtró el sobrenadante y se efectuaron los controles bacteriológicos y micológicos. El aislamiento primario se realizó en la línea celular establecida MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), obtenida del Banco Argentino de Células (ABAC), en calidad de certificada como libre de vDVB. Como medio de crecimiento se utilizó MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco) y 1% de antibiótico-antimicótico, como medio de crecimiento (MC) y el mismo medio exento de SFB como medio de mantenimiento (MM). Las infecciones se efectuaron según metodologías de rutina. Se utilizaron tres muestras de cada órgano y se realizaron cuatro pasajes ciegos. Los sobrenadantes de los cultivos infectados que evidenciaron efecto citopático (ECP) se centrifugaron a 5.000 rpm por 20 minutos a fin de decantar los detritos celulares. Para identificar los aislamientos, éstos sobrenadantes de cultivos fueron sometidos a:

a) Inmunofluorescencia directa (IFD): Se realizó según el procedimiento original de Coons *et al.* (1971) (FAO, 1988). Las células infectadas se desprendieron de sus soportes antes de que alcanzaran a exhibir el 100% de efecto citopatogénico (ECP), se lavaron con PBS y se ajustó la concentración celular a 10^5 cél/ml. Se realizaron las improntas por duplicado en portaobjetos grabados. Fueron fijadas con acetona pura por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron e incubaron con el anticuerpo anti vDVB, VMRD, Cat. 210-61-BVD Direct FA conjugate, según indicaciones del fabricante. Se observó la clásica fluorescencia citoplasmática característica del virus en estudio. Todos los pasajes positivos en ECP fueron confirmados por IFD.

b) Neutralización (NT): Los líquidos sobrenadantes de los cultivos infectados que evidenciaron ECP fueron centrifugados por 20 minutos a 5.000 rpm. a fin de decantar los detritos celulares y se enfrentaron en una prueba clásica de neutralización viral (NT) con un antisuero policlonal anti vDVB, utilizando la Cepa CP Singer, que fue previamente elaborado y titulado por el grupo de trabajo de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Esperanza, luego de producirlo en un bovino libre del virus DVB y de anticuerpos contra el mismo. El chequeo de esta condición del animal fue hecho en el Laboratorio del Centro de Virología Animal- Bs.As. por aislamiento y detección de anticuerpos por Inmunofluorescencia (I.F.). El antisuero posee un título seroneutralizante de 1/160. La prueba de neutralización 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 dos veces con intervalo de 15 días para corroborar su repetibilidad.

III.2.2. Histopatología e Inmunohistoquímica

Para las técnicas de histopatología e inmunohistoquímica las muestras obtenidas y colocadas en formol bufferado al 10% se procesaron de la siguiente manera: Dentro de las 24 horas de obtenidas las muestras durante la necropsia, se tomaron trozos pequeños de los distintos órganos y se colocaron nuevamente en formol bufferado al 10% para completar la fijación, por 12 horas como máximo. Luego se realizó la deshidratación en alcoholes de diferentes graduaciones (70°, 96°, 100°), el aclaramiento con xileno y la inclusión en parafina. Se realizaron cortes seriados de

4-5 μm de cada órgano procesado, obteniendo 4 secciones de cada órgano, que se montaron: 1) en portaobjetos con gelatina para histopatología de rutina, 2) en portaobjetos con Poli-L-Lisina para realizar inmunohistoquímica con el genotipo I y II, y 3) en portaobjetos con Poli-L-Lisina para control negativo.

III.2.2.1. Análisis Histopatológico

Para el estudio histopatológico, los cortes montados en portaobjetos con gelatina se tiñeron con la coloración de Hematoxilina -Eosina (H.E.).

Las lesiones microscópicas en los diferentes órganos fueron debidamente evaluadas y protocolizadas.

Con el propósito de valorar en mejor forma los grados lesionales microscópicos en los diferentes órganos, éstos fueron descritos de acuerdo al método de escalamiento tipo Likert (Hernández Sampieri *et al.*, 2000), teniendo en cuenta las siguientes pautas:

0: ausencia de lesiones

1: lesión leve

2: lesión moderada

3: lesión severa

Luego se consideró la frecuencia de distribución de lesiones en los 50 fetos abortados analizados, teniendo en cuenta los grados de lesión por afección. También se compararon las mismas en fetos con y sin aislamiento de virus de la Diarrea Viral Bovina.

Para determinar si existió una relación estadísticamente significativa entre las lesiones observadas en los fetos y el aislamiento del vDVB, los datos se analizaron con el programa estadístico Statgraphics plus, versión 3.0, utilizando tablas de frecuencias y el test de Chi-cuadrado. Para ello, los grados de lesión por afección fueron simplificados, utilizando 2 opciones:

0: ausencia de lesiones

1: lesión leve, moderada y severa

III.2.2.2. Recuperación Antigénica

Se probaron diferentes métodos de recuperación antigénica, analizando el efecto de la aplicación de digestión proteolítica con tratamientos enzimáticos distintos (Ficina, Tripsina, Pepsina, Proteinasa K) y su combinación con tratamiento en microondas, empleando diferentes concentraciones para los dos anticuerpos primarios utilizados. Cada ensayo fue realizado sobre 10 portaobjetos, 7 materiales problema, 1 control positivo, 1 control negativo, y un control negativo de la técnica.

Para la digestión enzimática se utilizaron las siguientes preparaciones comerciales:

- Ficina (Zymed ® Digest-All Cat No. 00-3006)
- Tripsina (Zymed ® Digest-All Cat No. 00-3006)
- Pepsina (Zymed ® Digest-All Cat No. 00-3006)
- Proteinasa K (Dako ® Cat No. S3020)

El tratamiento en microondas se realizó en un equipo de uso doméstico (potencia máxima 1000 W). Como solución se utilizó Buffer Citrato 0,01 M pH 6,0, el cual se

calentó 3 minutos a 100% de potencia y 12 minutos a 40% de potencia. Luego se dejaron 20 minutos los preparados dentro del microondas apagado (Ortega *et al.*, 2004).

En la Tabla 2, se presentan los diferentes métodos de recuperación antigénica utilizados.

Tabla 2: Tratamientos de recuperación antigénica realizados, combinados con las diluciones de anticuerpos primarios utilizadas

Tratamientos de recuperación antigénica probados, y su combinación con distintas diluciones de anticuerpos y temperatura de incubación del mismo		
Tipo de Tratamiento	Diluciones de anticuerpos probadas	Temperatura y tiempo de incubación
Sólo Microondas	1:50	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:20	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:30	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
Pepsina con microondas	1:50	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:20	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:30	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
Pepsina sin microondas	1:50	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:20	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:30	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
Ficina con microondas	1:50	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:20	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:30	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
Ficina sin microondas	1:50	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:20	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°

Tabla 2 (cont.)

	1:30	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
Tripsina con microondas	1:50	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:20	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
Tripsina sin microondas	1:30	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:50	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
Proteínasa K con microondas	1:20	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:30	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
Proteínasa K sin microondas	1:50	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:20	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
Proteínasa K sin microondas	1:30	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°
	1:50	toda la noche a temperatura ambiente
		toda la noche a 4°

III.2.2.3. Inmunohistoquímica

A través de la técnica de inmunohistoquímica se realizó la identificación y se analizó la distribución de los antígenos virales del vDVB en los distintos tejidos, utilizando el método de Streptoavidina-biotina-peroxidasa.

La inmunohistoquímica se realizó en las muestras de los 50 fetos con los anticuerpos primarios para el genotipo I y para el genotipo II, pero no simultáneamente. La técnica se llevó a cabo en tandas de 10, incluyendo 7

portaobjetos con los materiales de los fetos problema, un control positivo, un control negativo y un control negativo para la técnica

Junto con los cortes seriados de los tacos de los órganos fetales que se montaron en portaobjetos tratados con Poli-L-lisina, se realizaron cortes seriados de órganos controles positivos y negativos. Como controles positivos del genotipo I del vDVB se utilizaron muestras de piel de un ternero persistentemente infectado facilitado por gentileza del Dr. Javier Lértora y órganos de un ternero infectado persistentemente con el vDVB detectado por aislamiento viral en sangre y órganos. Como control positivo del genotipo II se utilizaron extendidos de cultivos celulares infectadas con la cepa de referencia, cortesía del laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Como controles negativos se utilizaron cortes de órganos de otras especies. Además, como control negativo de la técnica se utilizaron cortes positivos donde se cambió el anticuerpo primario por un suero normal.

De cada feto se procesaron para IHQ los siguientes órganos: hígado, corazón, pulmón, riñón, ganglio linfático, válvula, bazo, timo, y otros, tales como placenta, tiroides, piel, cerebro y cerebelo.

Los cortes seriados de los diferentes órganos montados en portaobjetos con Poly-L-lisina, se trataron de la siguiente manera: Antes de realizar la técnica, los cortes fueron colocados en estufa a 60° durante 10 minutos, luego se desparafinaron en 2 cubetas con xilol (xilol A y xilol B) durante 15 minutos y 10 minutos, respectivamente. La hidratación se hizo en dos baños de alcohol 100° (alcohol 100° A y B) durante dos minutos cada uno, luego en alcohol 96° durante dos minutos, y posteriormente en alcohol 70° durante dos minutos. Después de la hidratación se lavaron con PBS, durante 5 minutos. Para la inactivación de la peroxidasa endógena

se utilizó una solución de H₂O₂ en metanol durante 20 minutos (10+10). Para 10 portaobjetos, que se colocaron dorso con dorso en el porta slide, se utilizaron 4 ml de H₂O₂ en 36 ml de metanol. A los 10 minutos de la incubación, se agregaron 4 ml adicionales de H₂O₂ y se incubaron 10 minutos más. Se realizó un lavado con agua destilada durante 5 minutos. La recuperación antigénica fue realizada con tratamiento proteolítico con Proteinasa K (Dako ® Cat No. S3020), secando los preparados y agregando la enzima a cada portaobjetos a T° ambiente e incubando por 10 minutos, en cámara húmeda. Luego de la recuperación antigénica, los cortes fueron lavados tres veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado. Posteriormente, los cortes se secaron y se colocó suero normal de cabra al 1%, durante 15 minutos, que se utilizó como solución de bloqueo. Cumplido el tiempo de incubación, se escurrió el exceso de solución y sin lavado posterior, se aplicó el anticuerpo primario, dejando incubar toda la noche a temperatura ambiente.

Como anticuerpos primarios se utilizaron dos anticuerpos monoclonales, para cada uno de los genotipos del virus. Para el genotipo 1 se utilizó el anticuerpo elaborado en la línea celular 157 (VMRD ® Cat No. 157), dirigido contra la proteína E2 (gp 53) del genotipo I del virus de la diarrea viral bovina, el cual se liga específicamente al vDVB genotipo 1 y no al vDVB genotipo 2. Para el genotipo 2, se utilizó el anticuerpo elaborado en la línea celular BA-29 (VMRD ® Cat. No. BA-29), dirigido contra la proteína E2 (gp 53) del genotipo 2 del vDVB, el cual se liga específicamente al vDVB genotipo 2 y no al vDVB genotipo 1. Ambos anticuerpos se utilizaron diluídos 1:30 con incubación toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se realizaron dos lavados con PBS, durante 5 minutos cada uno. Luego los cortes se secaron y se aplicó el anticuerpo secundario biotilado (Zymed

® Cat No. 81-6540, dilución 1:120), durante un período de 30 minutos. Se volvió a lavar dos veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado.

Luego de secados, se aplicó la estreptavidina-biotina-peroxidasa (Biogenex ® Cat No. HK330-9K), durante 30 minutos, después se realizaron dos lavados, se volvieron a secar y se colocó el cromógeno Aminoetilcarbazol (AEC), (Biogenex ® Cat No. HK139-5K) durante 15 minutos. Posteriormente se hicieron dos lavados con agua destilada, de 5 minutos cada uno.

La coloración de contraste se realizó con Hematoxilina Biopur, 1:2 en agua destilada, durante 30 segundos a 1 minuto, luego se lavó con agua destilada, se realizó el viraje en agua corriente, y se volvió a lavar dos veces con agua destilada, durante 3 minutos cada uno. El montaje fue realizado con Ultramount (Dako® cat. N° S1964).

II.2.3. Western blot

La técnica de western blot fue realizada para medir la especificidad del anticuerpo 157, dirigido contra la glicoproteína E2 (gp 53) del vDVB, con el que obtuvimos inmunomarcación en órganos fetales.

II.2.3.1. Procesamiento de las muestras utilizadas para western blot

Se utilizaron 3 cepas de referencia del vDVB genotipo I (NADL, Singer y Nebraska), y gp 53 purificada, cedidas gentilmente por la profesora Adela Gollán, del laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Esperanza,

para realizar la técnica de western blot y medir la especificidad del anticuerpo para el genotipo I que utilizamos.

Se tomaron 100 μ l de cada cepa y de la proteína purificada, y se mezclaron con igual volumen de buffer de lisis (RIPA). Cada muestra fue mezclada con vortex, durante 1 minuto, cada 5 minutos por 20 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 14.000 g en centrífuga refrigerada durante 30 minutos (Chen *et al.*, 2007). Se separó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en igual volumen de buffer RIPA. De las 3 cepas utilizadas, se midieron proteínas en el sobrenadante y en el pellet, y se utilizó también el sobrenadante del purificado de E2 (gp 53). La determinación de la concentración proteica de cada muestra se realizó mediante el método Lowry modificado (Bio-Rad). Este proceso se realizó en microplacas y las lecturas se hicieron en un lector de microplacas a 650-700 nm. Se utilizó un patrón de BSA para realizar las inferencias.

II.2.3.2. Técnica de western blot

Se llevaron a cabo electroforesis vertical en geles discontinuos con un 10% de acrilamida-bisacrilamida (29:1) en condiciones desnaturizantes para el gel de resolución. Las muestras fueron diluídas 1:2 con buffer de muestra para SDS-PAGE, e incubadas en baño termostático a 95° C por 5 minutos. Se sembraron los volúmenes adecuados para 40 μ g de proteínas, y cada muestra fue sembrada dos veces. Se realizó una corrida electroforética durante 45 minutos a 25 mA para el gel de apilamiento y luego durante 90 minutos a 50 mA para el gel de resolución. Se utilizó

el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1% de SDS pH 8,3. Los marcadores de peso molecular (PM) que se utilizaron se detallan en la Tabla 3.

Luego de terminada la corrida se procedió a la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa para lo cual se utilizó el buffer de transferencia Towbin modificado compuesto por Tris-Glicina con 20% de metanol. Se realizó la transferencia en frío a 100 V durante 3 horas. Al término de este período se coloreó la membrana con el colorante Rojo Ponceau para ver la efectividad de la transferencia. Con el mismo sentido se coloreó el gel con Coomassie Brilliant Blue 250G. Se procedió luego a la inmunodetección de la glicoproteína E2 (gp 53) del genotipo I del vDVB, con el anticuerpo monoclonal 157. La membrana fue cortada por la mitad, para probar dos diluciones del anticuerpo, 1:50 y 1:100.

Tabla 3: Estándares de PM para SDS-PAGE, amplio espectro. Bio-Rad.

Proteína	Peso Molecular kDa
Miosina	200
β -galactosidasa	116,25
Fosforilasa b	97,40
Albúmina sérica	66,20
Ovoalbúmina	45
Anhidrasa carbónica	31
Inhibidor de tripsina	21,50
Lisozima	14,40
Aprotinina	6,50

Protocolo para la inmunodetección de la proteína en la membrana de nitrocelulosa

1. Se enjuagó la membrana de nitrocelulosa con agua destilada y luego con TBS-T hasta la desaparición del colorante.
- 2.. Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con TBS-T leche 5%, 1 hora a temperatura ambiente en agitación
3. Se realizaron lavados a temperatura ambiente con TBS-T, en agitación:
 - Dos lavados rápidos
 - Un lavado de 15 minutos
4. Se incubaron ambas membranas con las dos diluciones del anticuerpo primario durante toda la noche en heladera. Para las diluciones del anticuerpo primario se utilizó buffer de bloqueo y se realizó mediante la colocación del anticuerpo que cubra la membrana y un folio o nylon sobre la misma para que distribuya el anticuerpo por capilaridad.
5. Se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente con TBS-T, en agitación.
6. Se incubaron ambas membranas con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Para la dilución (1:250) se utilizó buffer de bloqueo y se procedió como en el paso 4.
7. Se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente con TBS-T, en agitación.
8. Se reveló con quimioluminiscencia.
9. Se lavó con agua destilada.
10. Se secó la membrana entre papeles secantes.

Las membranas de nitrocelulosa reveladas con quimioluminiscencia fueron escaneadas con un escáner de oficina (HP Deskject F 380) y las imágenes obtenidas fueron guardadas con formato JPG.

III.2.4. Concordancia entre técnicas diagnósticas utilizadas

Para determinar si existió relación significativa entre las técnicas diagnósticas utilizadas, los datos se analizaron con el programa estadístico Statgraphics plus, versión 3.0, utilizando tablas de frecuencias y el test de Chi-cuadrado. Para ello, los resultados de cada técnica fueron estipulados de la siguiente manera

0: resultado negativo;

1: resultado positivo.

Entre los resultados obtenidos con el aislamiento viral, la Inmunofluorescencia directa y la técnica de Inmunohistoquímica se calculó la concordancia absoluta y el índice estadístico de Kappa (K) (Henández Sampieri *et al.*, 2000).

IV- RESULTADOS

IV- RESULTADOS

IV.1. Aislamiento viral e Inmunofluorescencia Directa

De los 50 fetos analizados, se aisló el vDVB en 20 fetos, y 25 resultaron positivos a la IFD. (Anexos 2 y 3). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: Resultados de las técnicas de Aislamiento Viral e IFD en 50 fetos abortados

Feto N°	Aislamiento viral	IFD	Feto N°	Aislamiento viral	IFD
1	+	+	26	-	-
2	-	-	27	-	-
3	+	+	28	+	+
4	-	-	29	-	-
5	-	-	30	+	+
6	-	-	31	-	-
7	+	+	32	-	-
8	-	-	33	-	-
9	-	+	34	-	+
10	-	+	35	-	+
11	-	-	36	-	+
12	+	+	37	-	-
13	+	-	38	+	+
14	+	+	39	+	-
15	-	-	40	+	+
16	-	-	41	+	+
17	-	+	42	+	+
18	+	+	43	+	+
19	+	+	44	+	-
20	-	-	45	-	-
21	-	-	46	-	+
22	-	-	47	-	-
23	-	+	48	-	-
24	-	+	49	+	+
25	+	-	50	+	+

IV.2. Lesiones histopatológicas en órganos de los 50 fetos abortados y comparación entre los fetos con y sin aislamiento viral

IV.2.1. Lesiones histopatológicas en órganos de los 50 fetos abortados

En la Tabla 5 se presenta en porcentaje la frecuencia de lesiones en cada órgano de acuerdo al grado de lesión (Anexo 1).

Tabla 5: Frecuencia y grados de presentación de lesiones microscópicas en órganos de 50 fetos abortados

Lesiones Microscópicas	Leve (%)	Moderada (%)	Severa(%)
Hígado			
Congestión y Edema	4	16	0
Infiltrados mononucleares intersticiales	4	18	2
Tumefacción de hepatocitos	10	32	6
Focos de necrosis	10	12	0
Autólisis	0	6	8
Corazón			
Congestión y Edema	2	0	0
Infiltrados mononucleares intersticiales	10	10	4
Vasculitis	0	0	0
Autólisis	0	2	6
Pulmón			
Congestión y edema	10	22	0
Infiltrados mononucleares intersticiales	6	6	10
Focos de necrosis	10	4	0
Hiperplasia del tejido linfoide	14	0	0
Autólisis	0	0	4
Riñón			
Degeneración tubular	2	22	0
Necrosis tubular	2	4	0
Infiltrados mononucleares intersticiales	2	8	0
Autólisis	0	22	22
Adrenal			
Hiperplasia cortical	4	11	0
Atrofia cortical	0	4	0
Autólisis	0	11	14

Tabla 5 (cont.)

Ganglios linfáticos			
Depleción linfoidea	17	46	4
Necrosis linfoidea	8	2	0
Linfoadenitis	8	25	8
Hiperplasia linfoidea	6	4	0
Autólisis	0	2	6
Válvula ileo-cecal			
Necrosis del epitelio de las criptas en la mucosa	5	21	12
Depleción y necrosis linfoidea	7	16	2
Degen hialina pared arteriolas	2	0	0
Vasculitis	7	2	0
Autólisis	5	21	23
Bazo			
Depleción linfoidea	6	47	0
Necrosis linfoidea	2	4	0
Esplenitis	6	4	0
Hiperplasia pulpa blanca	4	0	0
Autólisis	4	10	12
Timo			
Depleción linfoidea	2	35	0
Necrosis linfoidea	4	11	0
Infiltrados leucocitarios	2	7	0
Autólisis	0	2	4

El hígado, el corazón y los pulmones se procesaron en los 50 fetos, el bazo y riñones en 49 fetos, ganglios linfáticos en 48, timo en 46, válvula ileocecal en 43 y las glándulas adrenales sólo en 28 de los 50 fetos.

El hígado del 50% de los fetos presentó cambios degenerativos en distintos grados (Figura 2), el resto de las lesiones hepáticas protocolizadas (congestión y edema, infiltrados mononucleares intersticiales y focos de necrosis) estuvieron presentes entre el 20 y el 24% de los mismos.

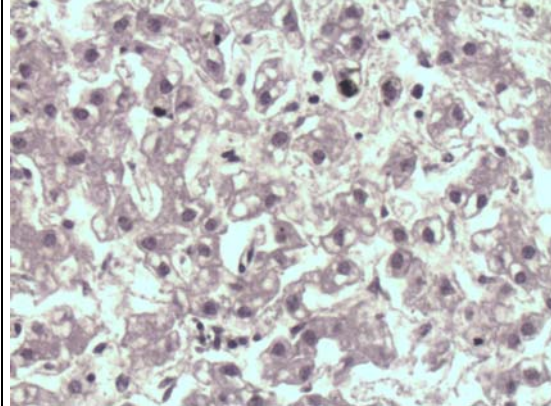
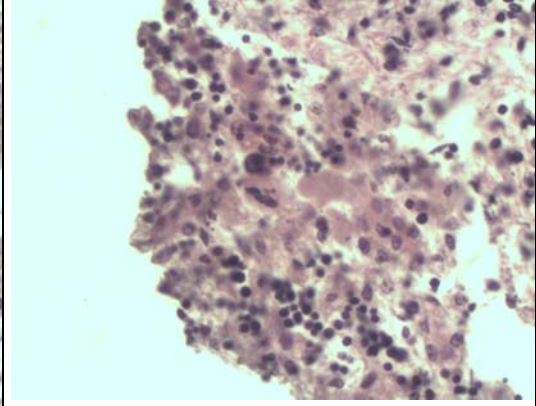
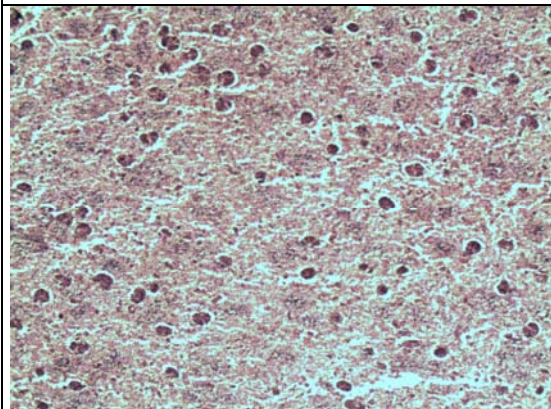
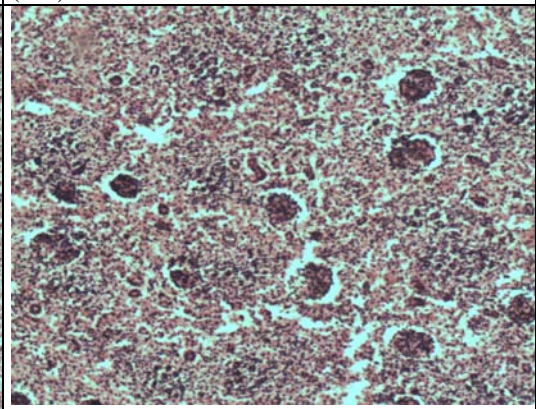
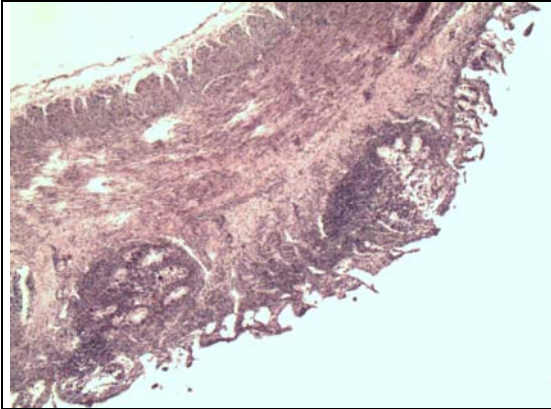
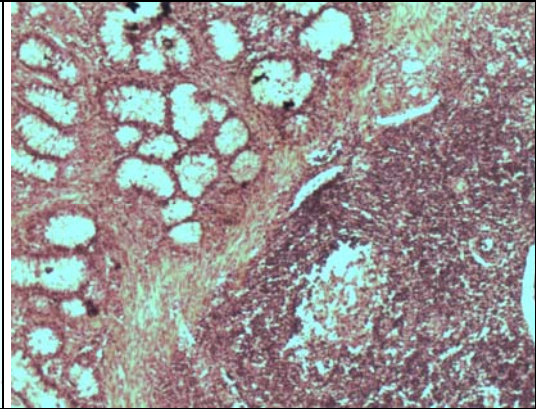
Los órganos linfáticos presentaron distintos grados de depleción linfoidea: en ganglios el 50% de los fetos (moderada a severa), en la válvula ileo-cecal el 26% (Figuras 6 y 7), en bazo el 53% (Figuras 12 y 13) y en timo el 37% (figuras 9, 10 y 11);

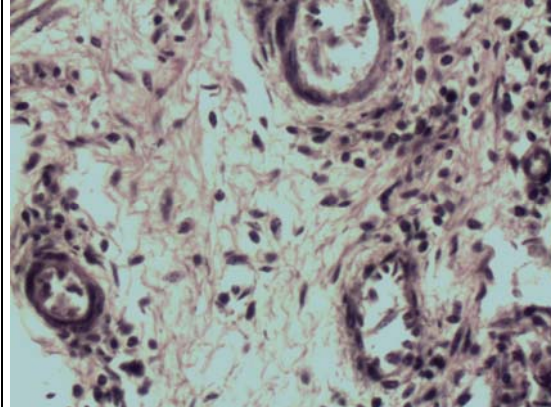
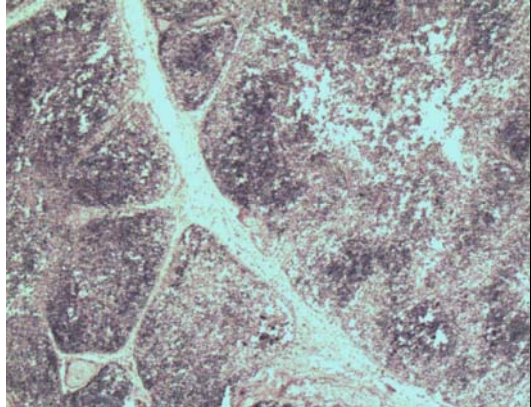
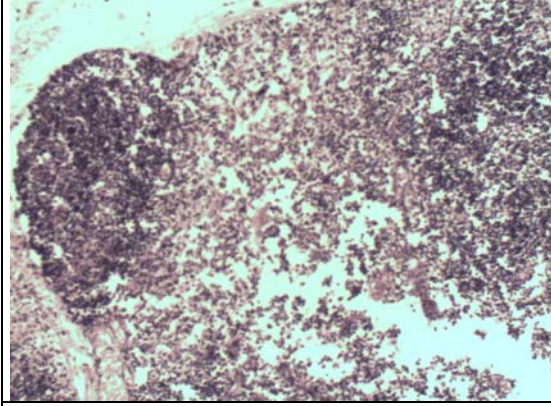
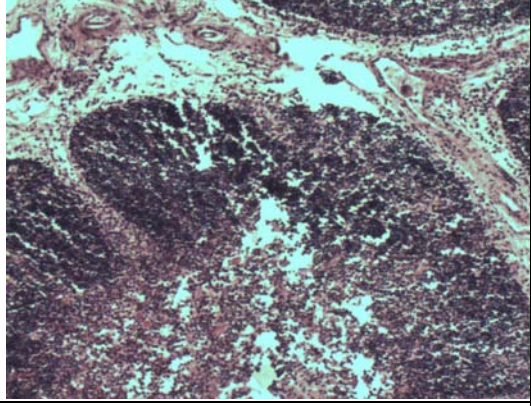
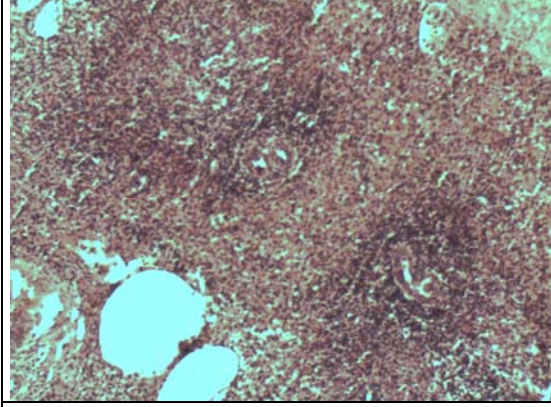
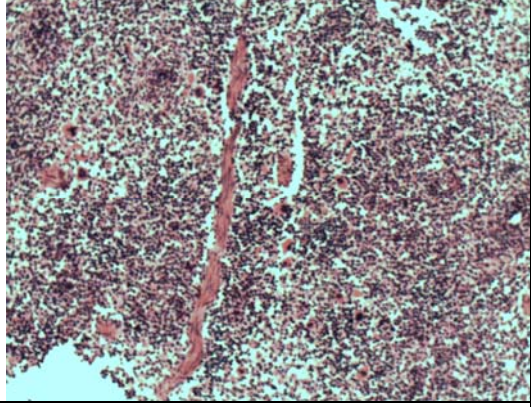
la necrosis linfoidea también fue observada en éstos órganos, aunque en menor porcentaje, comprendida entre el 6 y el 15%.

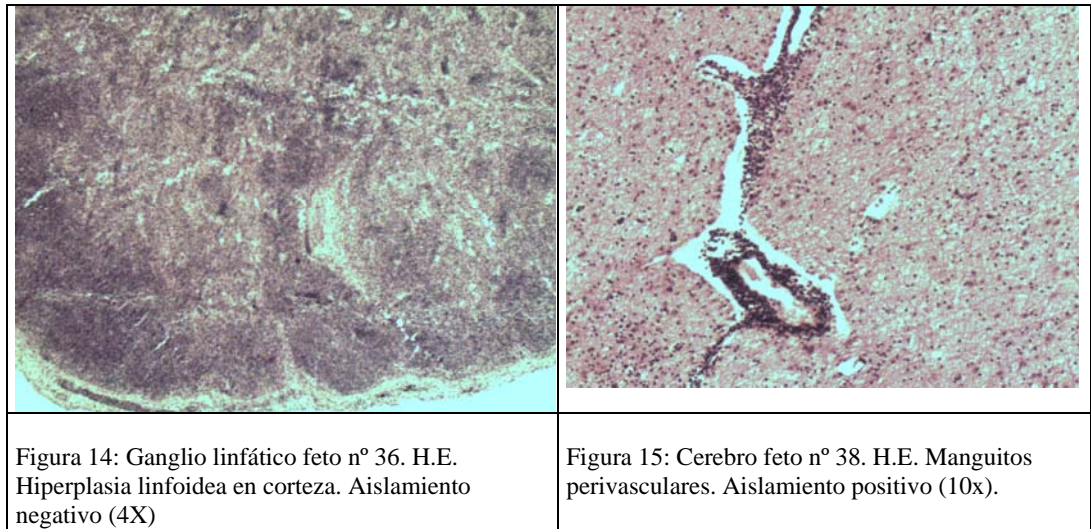
Los infiltrados mononucleares intersticiales se observaron en órganos parenquimatosos, aunque con distinta frecuencia de presentación: en hígado, corazón y pulmones estuvieron presentes entre un 20 y un 24%, en riñones en el 10% (Figuras 4 y 5) y en timo en el 9% de los fetos.

Los grados de autólisis en los distintos órganos fueron variables, la mayor frecuencia se observó en riñones (Figura 4) y en la válvula ileo-cecal, en casi la mitad de los fetos (45 y 49%, respectivamente). También fue frecuente en bazo (27%) y glándulas adrenales (25%), y en menor porcentaje en hígado (14%).

En algunos fetos también fueron procesados otros órganos, tales como tiroides, piel, cerebro, cerebelo, esófago y placenta (Anexo n°1). Se procesaron 25 glándulas tiroides del total de los fetos, la mayoría de las cuales no evidenció lesiones. Se procesaron 8 muestras de piel, y sólo en una de ellas se detectó degeneración vacuolar de la epidermis. En 13 muestras de cerebro se observaron 5 con lesiones de encefalitis (Figura 15), vacuolización y signos de necrosis neuronal. También fueron procesadas 9 muestras de cerebelo, la mayoría de las cuales no presentó cambios histológicos. El esófago fue procesado en dos fetos, encontrando en uno hiperplasia del epitelio y en otro hiper y paraqueratosis. Con respecto a la placenta, se analizaron 6 muestras, de las cuales sólo una presentó placentitis, con necrosis y calcificación, e infiltrados de polimorfonucleares.

	
<p>Figura 2: Hígado feto n° 11. H.E. Vacuolización marcada de hepatocitos. Aislamiento negativo (10X)</p>	<p>Figura 3: Corazón feto n° 38. H.E. Infiltrados mononucleares en epicardio. Aislamiento positivo (40x).</p>
	
<p>Figura 4: Riñón feto n° 14. H.E. Infiltrados mononucleares focales. Autólisis leve. Aislamiento positivo (4x)</p>	<p>Figura 5: Riñón feto n° 14. H.E Infiltrados mononucleares intersticiales Aislamiento positivo (10x)</p>
	
<p>Figura 6: Válvula ileocecal feto n° 1. H.E. Se observa acortamiento de vellosidades y placas de Peyer con depleción linfoidea. Aislamiento positivo (4X)</p>	<p>Figura 7: Válvula ileocecal feto n° 38. H.E Depleción linfoide en placas de Peyer. Aislamiento positivo (10x).</p>

	
<p>Figura 8: Válvula ileocecal feto n° 1. H.E Vasculitis en submucosa. Aislamiento positivo (40x)</p>	<p>Figura 9: Timo feto n°38. H.E. Depleción linfoidea. Aislamiento positivo (4x).</p>
	
<p>Figura 10: Timo feto n° 38. H.E Se observa depleción y necrosis linfoidea. Aislamiento positivo (10x).</p>	<p>Figura 11: Timo feto n° 1. H.E. Se aprecia depleción y necrosis linfoidea. Aislamiento positivo (10x)</p>
	
<p>Figura 12: Bazo feto n° 18 .H.E. Depleción linfoidea en pulpa blanca. Aislamiento positivo (10x).</p>	<p>Figura 13: Bazo feto n°20. H.E. Depleción linfoidea. Se observan células hematopoyéticas. Aislamiento negativo (10x)</p>



IV.2.2. Comparación de lesiones en órganos de fetos con y sin aislamiento de vDVB.

La comparación entre ambos grupos de fetos se realizó a través de tablas de distribución de frecuencias y con el test de Chi-cuadrado.

IV.2.2.1. Distribución de frecuencias de lesiones observadas

En la Tabla 6 se resumen los porcentajes de las lesiones encontradas en los fetos con y sin aislamiento del virus

Tabla 6: Frecuencias y grados de presentación de lesiones en órganos de fetos con y sin aislamiento de vDVB

Lesiones microscópicas	% de lesiones microscópicas en 50 fetos abortados	
	Con aislamiento (n=20)	Sin aislamiento (n=30)
Hígado		
Congestión y Edema	10	27
Infiltrados mononucleares intersticiales	25	23

Tabla 6 (cont.)

Tumefacción de hepatocitos	45	50
Focos de necrosis	20	23
Autólisis	15	13
Corazón		
Congestión y Edema	0	3
Infiltrados mononucleares intersticiales	25	23
Vasculitis	0	0
Autólisis	5	10
Pulmón		
Congestión y edema	30	33
Infiltrados mononucleares intersticiales	35	13
Focos de necrosis	10	17
Hiperplasia del tejido linfoide	20	10
Autólisis	5	3
Riñón		
Degeneración tubular	32	20
Necrosis tubular	5	7
Infiltrados mononucleares intersticiales	11	10
Autólisis	32	53
Adrenal		
Hiperplasia cortical	23	7
Atrofia cortical	8	0
Autólisis	8	40
Ganglios linfáticos		
Depleción linfoidea	74	62
Necrosis linfoidea	21	3
Linfoadenitis	53	34
Hiperplasia linfoidea	11	10
Autólisis	5	10
Válvula ileo-cecal		
Necrosis del epitelio en criptas	59	23
Depleción y necrosis linfoidea	47	12
Degen hialina pared arteriolas	0	4
Vasculitis	18	4
Autólisis	35	58
Bazo		
Depleción linfoidea	58	50
Necrosis linfoidea	11	3
Esplenitis	11	10
Hiperplasia pulpa blanca	11	0
Autólisis	21	30

Tabla 6 (cont.)

Timo		
Depleción linfoidea	47	30
Necrosis linfoidea	16	15
Infiltrados leucocitarios	5	0
Autólisis	5	7

Las lesiones más frecuentemente encontradas en el grupo de fetos con aislamiento del virus DVB fueron: tumefacción en células hepáticas, infiltrados mononucleares intersticiales en órganos parenquimatosos, con mayor porcentaje en los pulmones (35% de los fetos, de los cuales el 20% estaba afectado en forma severa); necrosis del epitelio de las criptas en la mucosa (59% de los fetos) y vasculitis (18%) en la válvula ileocecal; y en los órganos linfáticos depleción y necrosis linfoidea. La depleción se observó en ganglios linfáticos en el 74% de los fetos, la mayoría con grado moderado; en la válvula ileo-cecal en el 47%, en el bazo el 58% y en el timo el 47% de los fetos positivos. La necrosis linfoidea se encontró en 21%, 11% y 16% de los fetos en ganglios, bazo y timo, respectivamente.

En los fetos sin aislamiento, la depleción linfoidea en ganglios linfáticos fue observada en el 62%, pero la necrosis linfoidea sólo en un 3%.

La frecuencia de autólisis en los fetos positivos fue variable, principalmente en válvula ileo-cecal (35%) y en bazo (21%).

En pulmón, los infiltrados mononucleares intersticiales fueron más frecuentes en fetos positivos (35%) con respecto a los negativos (13%). Los focos de necrosis estuvieron más presentes en los negativos (10% vs. 17%).

Los fetos con aislamiento viral exhibieron mayor frecuencia de degeneración tubular en riñón, y mayor porcentaje de hiperplasia de la corteza adrenal.

El 59% de los fetos positivos mostró necrosis en el epitelio de las criptas de la mucosa de la válvula ileo-cecal, con respecto al 23% de los negativos. También en este órgano la depleción y necrosis linfoidea fue más frecuente en los fetos positivos.

En el bazo, se observó gran diferencia en la frecuencia de necrosis linfoidea (11% en positivos con respecto al 3% en negativos).

En el timo, la depleción linfoidea fue más frecuente en fetos positivos (47%) que en negativos (30%), aunque la frecuencia de aparición de necrosis linfoidea fue similar en ambos grupos de fetos.

La vasculitis fue observada en la válvula ileocecal, donde se evidenció con mayor frecuencia en fetos positivos (18% versus 4%, Figura 8).

La autólisis se presentó en la mayoría de los órganos de los fetos negativos, a excepción del hígado, pulmón y timo donde los porcentajes fueron similares en ambos grupos de fetos.

IV.2.2.2. Análisis estadístico.

En la Tabla 7, se presentan sólo las lesiones que mostraron relación significativa con el aislamiento viral.

Tabla 7: Valores de Chi-cuadrado y p para lesiones histopatológicas que presentan relación significativa con el aislamiento viral

Lesión histopatológica observada	Valor de Chi-cuadrado	Valor de p
Necrosis linfoidea en ganglio linfático	3,81	0,05
Necrosis del epitelio de la mucosa en la válvula ileo-cecal	5,62	0,01
Depleción y necrosis linfoidea en placas de Peyer de la válvula ileocecal	6,81	0,009

Las Tablas 8, 9 y 10 muestran las frecuencias de presentación de estas lesiones en los fetos con y sin aislamiento viral, y se determina el valor del índice kappa.

Tabla 8: Aislamiento vs. Necrosis linfoidea en Ganglio linfático

	<i>Aislamiento negativo</i>	<i>Aislamiento positivo</i>	
<i>Ganglio sin Necrosis linfoidea</i>	28 58,33%	15 31,25%	43 89,58%
<i>Ganglio con Necrosis linfoidea</i>	1 2,08%	4 8,33%	5 10,42%
	29 60,42%	19 39,58%	48 100%

Concordancia: 0,66. Índice Kappa: 0,19

Tabla 9: Aislamiento vs. Necrosis del epitelio de la mucosa en la válvula ileocecal

	<i>Aislamiento negativo</i>	<i>Aislamiento positivo</i>	
<i>Válvula ileocecal sin necrosis del epitelio de la mucosa</i>	20 46,51%	7 16,28%	27 62,79%
<i>Válvula ileocecal con necrosis del epitelio de la mucosa</i>	6 13,95%	10 23,26%	16 37,21%
	26 60,47%	17 39,53%	43 100%

Concordancia: 0,69. Índice Kappa: 0,35

Tabla 10: Aislamiento vs. Depleción y necrosis linfoidea en la válvula ileocecal

	<i>Aislamiento negativo</i>	<i>Aislamiento positivo</i>	
<i>Válvula ileocecal sin depleción y necrosis de placas de Peyer</i>	23 53,49%	9 20,43%	32 74,42%
<i>Válvula ileocecal con depleción y necrosis de placas de Peyer</i>	3 6,98%	8 18,60%	11 25,58%
	26 60,47%	17 39,53%	43 100%

Concordancia: 0,72. Índice Kappa: 0,37

IV.3. Recuperación antigénica

Se evaluaron diferentes métodos de recuperación antigénica para permitir la inmunodetección del virus de la Diarrea Viral Bovina en las muestras de fetos obtenidas durante la necropsia y fijadas con formol.

La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos con la aplicación de los diferentes tratamientos, cada uno sobre 10 portaobjetos, 7 con cortes de órganos de materiales problema, un control positivo, un control negativo y un control negativo de la técnica de IHQ utilizando distintas diluciones de ambos anticuerpos primarios. Se observaron resultados similares con la incubación a temperatura ambiente y a 4°.

Tabla 11: Resultados obtenidos con los diferentes tratamientos de recuperación antigénica aplicados en 10 cortes de tejidos

Tratamientos realizados	Diluciones de Ac. Primarios (Incub: o.n. a T° amb. y a 4°)	Resultados obtenidos		
		Tinción específica	Tinción inespecífica	Conservación del tejido
Sólo Microondas	1:50	-	+	Regular
	1:20	-	++	
	1:30	-	++	
Pepsina con microondas	1:50	+	+	Malo
	1:20	+	++	
	1:30	+	++	
Pepsina sin microondas	1:50	+	++	Malo
	1:20	+	++	
	1:30	+	+++	
Ficina con microondas	1:50	-	+	Malo
	1:20	-	+	
	1:30	-	+	

Tabla 11 (cont.)

Ficina sin microondas	1:50	-	+	Regular
	1:20	-	+	
	1:30	-	+	
Tripsina con microondas	1:50	-	++	Malo
	1:20	+	++	
	1:30	+	+++	
Tripsina sin microondas	1:50	-	+	Malo
	1:20	+	+++	
	1:30	+	+++	
Proteinasa K con microondas	1:50	-	+	Malo
	1:20	+	++	
	1:30	+	++	
Proteinasa K sin microondas	1:50	-	+	Regular
	1:20	+	++	
	1:30	++	+	

Intensidad de reacción: - sin tinción; + tinción débil; ++ tinción moderada; +++ tinción fuerte.

Cuando no se efectuó ningún tratamiento de recuperación antigénica, la inmunomarcación fue negativa en todos los preparados en las diferentes diluciones con el anticuerpo primario.

Tampoco se obtuvo inmunomarcación cuando se utilizó ficina o microondas sólo, probando diferentes diluciones del anticuerpo primario.

El tratamiento enzimático combinado con el microondas produjo gran destrucción del tejido, cualquiera sea la enzima utilizada.

Asimismo, la digestión enzimática con tripsina y con pepsina produjo una alta destrucción de los tejidos y reacciones inespecíficas, tanto en los controles negativos como en el resto de las muestras.

El tratamiento más efectivo fue el realizado con proteinasa K, utilizando diluciones 1:30 para los anticuerpos primarios, con incubación durante toda la noche a temperatura ambiente.

IV.4. Inmunohistoquímica en órganos de fetos abortados para la identificación de antígenos del virus de la Diarrea Viral Bovina

De los 50 fetos bovinos abortados a los que se realizó inmunohistoquímica sobre tejidos, se obtuvieron 26 fetos con inmunorreactividad para el genotipo I del virus. Se consideraron positivos a IHQ los fetos que presentaron inmunorreactividad en por lo menos uno de los órganos procesados. La reacción positiva se observó como estructuras granulares citoplasmáticas, de color rojo, de distinto diámetro, en células epiteliales, células musculares lisas, células nerviosas, linfocitos y macrófagos. No se detectaron inmunomarcación de antígenos del genotipo II del vDVB en ninguno de los fetos.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12: Inmunorreactividad para el Genotipo I del vDVB en diferentes órganos de fetos bovinos positivos a IHQ

Feto N°	Organos con inmunomarcación								
	Hígado	Corazón	Pulmón	Riñón	Ganglio	Válvula	Bazo	Timo	Otros
1	-	-	-	-	X	X	-	-	-
5	X	-	X	-	-	-	X	-	-
7	-	-	-	-	X	-	X	X	Plac, Tir, Piel
8	X	-	X	-	-	-	X	X	Plac
10	-	-	X	-	X	-	-	X	-
11	X	-	-	-	-	X	-	X	-
12	-	-	X	-	X	X	-	-	-
14	-	-	-	X	-	X	-	-	-
17	-	-	-	X	X	-	X	-	-
18	-	-	-	-	-	X	X	-	-

Tabla 12 (cont.)

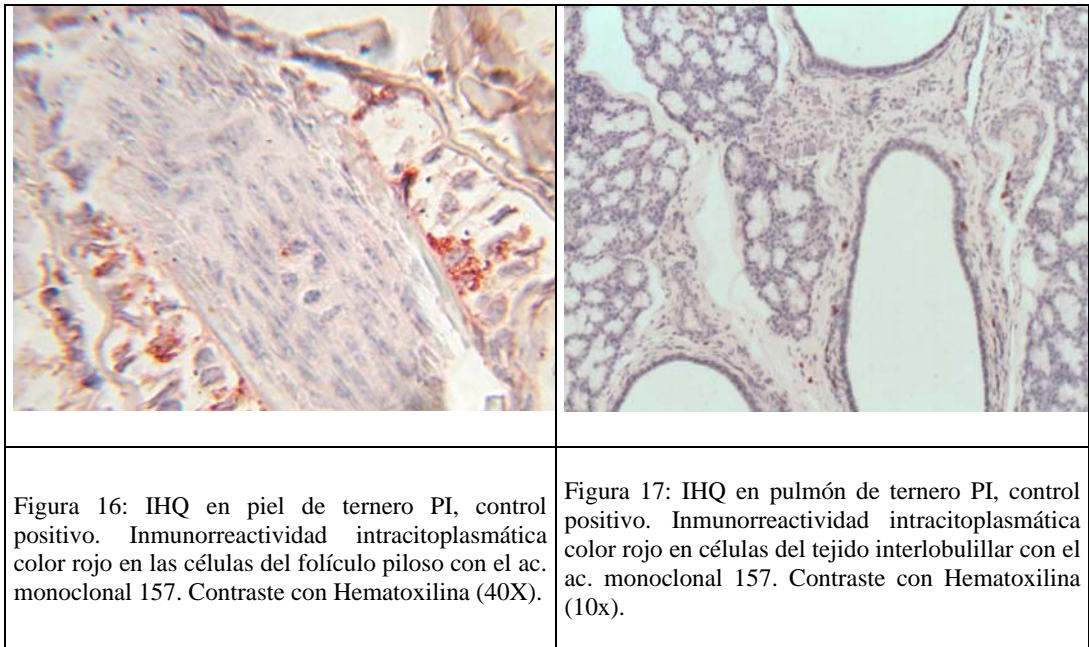
22	-	-	x	x	x	-	x	-	-
25	-	-	-	-	-	x	x	-	-
28	-	-	-	-	x	x	-	x	-
29	x	-	x	-	x	-	x	-	Cerebro
30	x	-	-	-	x	-	-	x	-
33	-	x	-	-	x	x	x	x	-
34	x	-	-	-	x	-	-	x	-
35	-	-	-	-	x	x	x	-	-
38	-	x	x	-	x	x	x	x	-
39	-	-	-	-	-	-	x	x	-
40	-	-	-	-	x	x	x	-	-
43	-	-	-	-	x	-	x	-	-
45	x	x	-	-	-	x	-	-	-
48	-	x	-	-	x	x	x	x	-
49	-	-	-	-	-	x	x	-	-
50	-	-	x	-	-	x	-	-	-
Totales	7	4	8	3	16	15	16	11	
%	26,92	15,38	30,76	11,53	61,53	57,69	61,53	42,3	

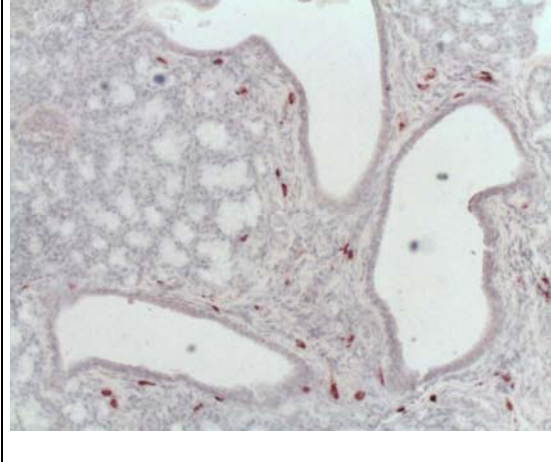
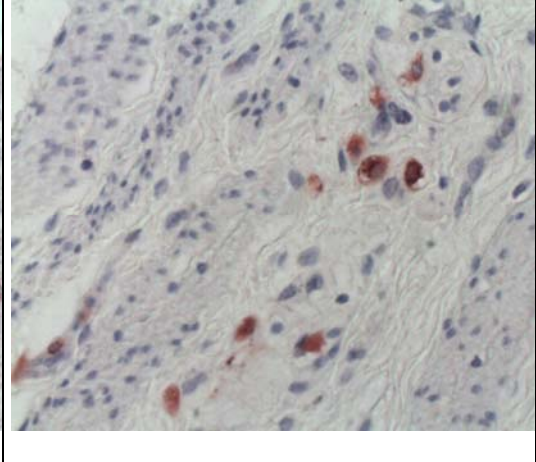
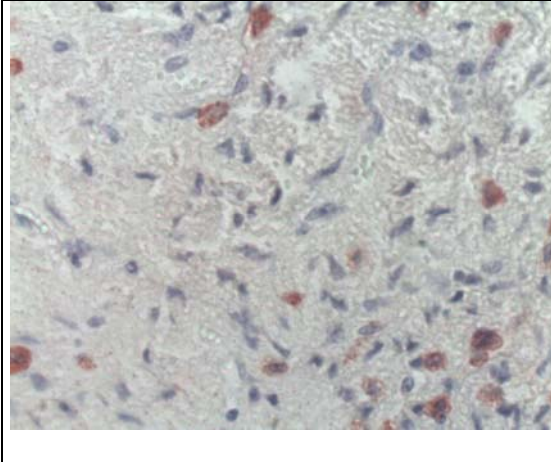
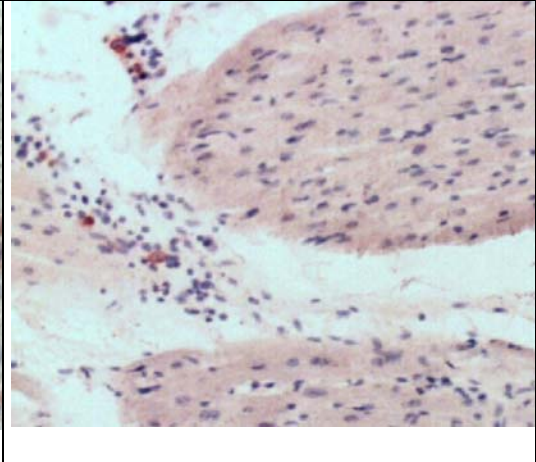
Los órganos de fetos con mayor frecuencia de inmunomarcación fueron: el bazo y los ganglios linfáticos (16 muestras, Figuras 28 y 29), la válvula ileo-cecal (15 muestras, Figuras 23 y 24) y el timo (11 muestras, Figura 22), seguidos por los pulmones y el hígado, que presentaron inmunorreactividad en 8 y 7 muestras respectivamente. En el corazón se observó inmunorreactividad en 4 muestras (Figuras 19, 20 y 21) y en el riñón sólo en 3 muestras (Figura 27). Otros órganos positivos en un feto fueron la glándula tiroidea, la piel y la placenta. Este último órgano resultó positivo en otro feto (n° 8), y el cerebro resultó positivo en una sola muestra (n° 29).

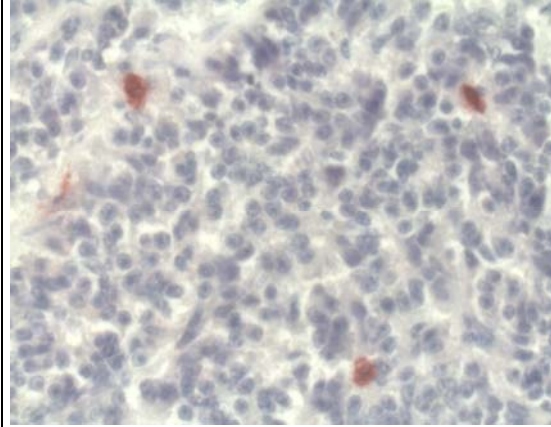
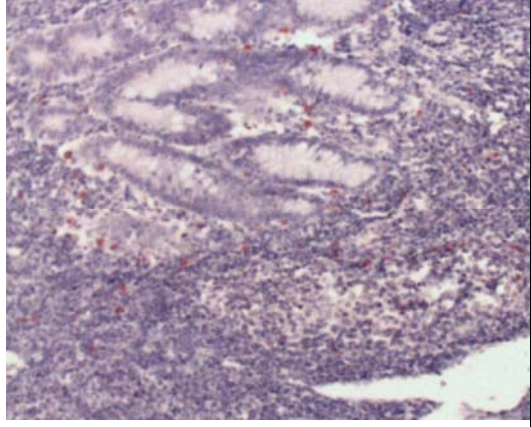
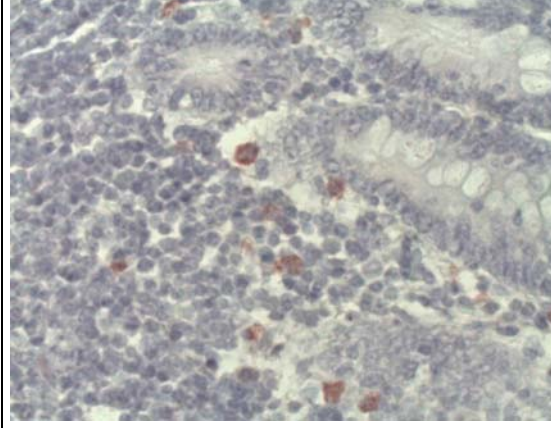
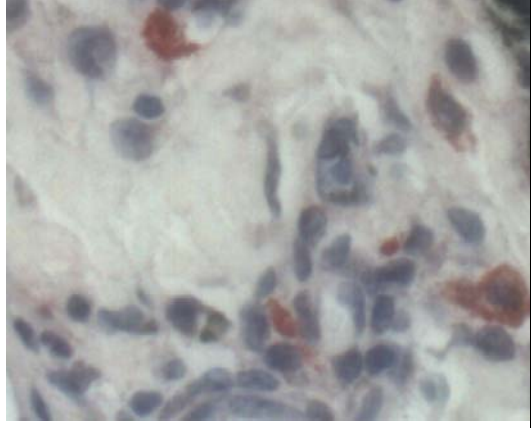
Las células que resultaron inmunomarcadas fueron macrófagos y linfocitos en bazo y ganglios linfáticos (Figura 28), células epiteliales de las criptas (Figuras 23 y 24), células del músculo liso de los vasos sanguíneos (Figuras 26 y 29), macrófagos y linfocitos en la válvula ileocecal (Figuras 23 y 24), linfocitos en el timo (Figura 22), células epiteliales y del tejido intersticial en pulmones y riñones (Figuras 27), hepatocitos y células de Kupffer en el hígado, y en el corazón los cardiomiocitos

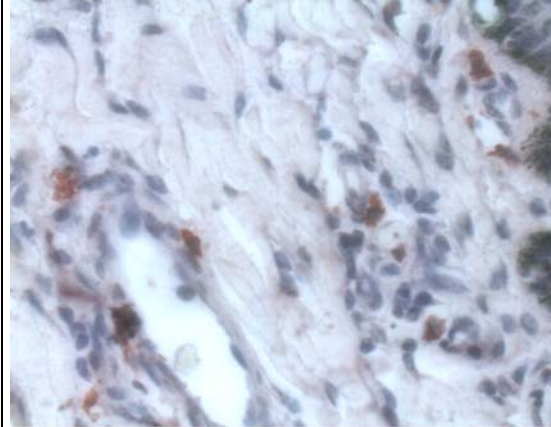
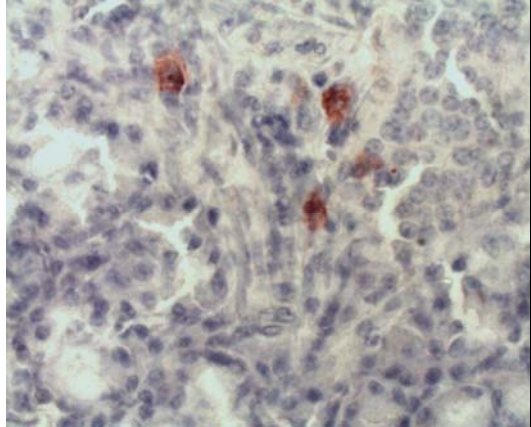
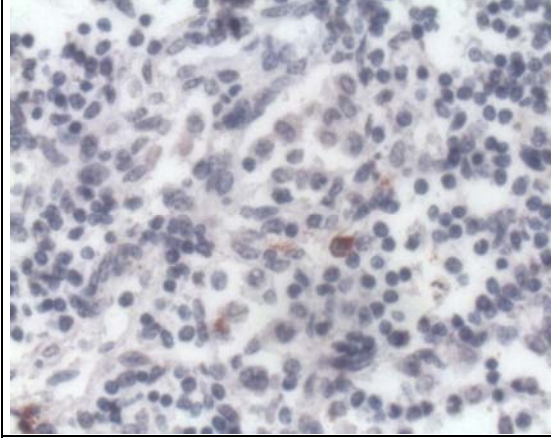
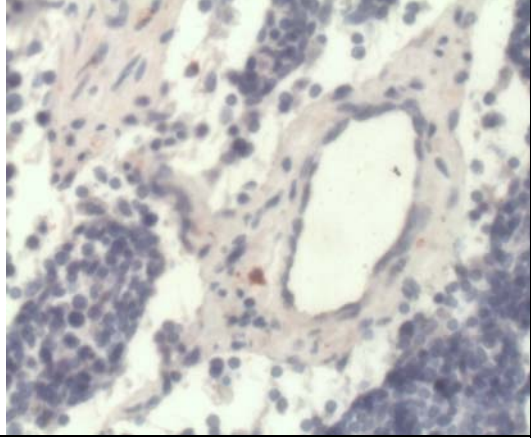
(Figura 20), las células conjuntivas (Figura 19) y las células del sistema de conducción (Figuras 19 y 21). En la piel de un feto hubo inmunorreacción en las células epiteliales, macrófagos de la dermis y células musculares de la pared de los vasos sanguíneos (Figuras 25 y 26).

En ningún feto se obtuvo inmunomarcación en todos los órganos. Solamente en 2 la reacción se observó en 6 órganos (fetos n° 7 y 38) y en 4 fetos en 5 órganos (fetos n° 8, 29, 33 y 48). Un solo feto presentó inmunorreactividad en 4 órganos (feto n° 22), mientras que la gran mayoría exhibieron reacción positiva en 3 órganos (11 fetos) y 2 órganos (8 fetos).



	
<p>Figura 18: IHQ en pulmón de ternero PI, control positivo. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en células del tejido interlobulillar con ac. monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (10x).</p>	<p>Figura 19: IHQ en corazón feto nº 33 Inmunomarcación intracitoplasmática en células del tejido conjuntivo y del sistema de conducción. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (10x).</p>
	
<p>Figura 20: IHQ en corazón de feto nº 38. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en cardiomiocitos. Ac. monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (10x)</p>	<p>Figura 21: IHQ en corazón feto nº 38 Inmunomarcación intracitoplasmática color rojo en células del sistema de conducción Ac. Monoclonal 157 Contraste con Hematoxilina (10x).</p>

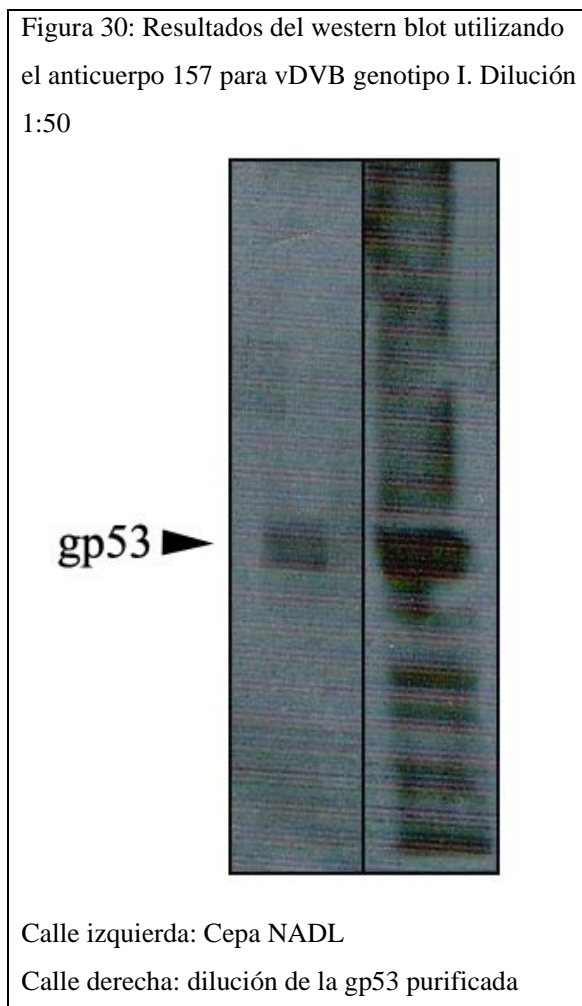
	
<p>Figura 22: IHQ en timo, feto n° 11: Inmunomarcación intracitoplasmática color rojo en células del parénquima y del intersticio. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (40x)</p>	<p>Figura 23: IHQ en válvula ileocecal del feto n° 28. Inmunomarcación intracitoplasmática en células epiteliales glandulares y del corion de la válvula ileocecal. Ac. Monoclonal 157 (10x).</p>
	
<p>Figura 24: IHQ en válvula ileocecal del feto n° 28. Inmunomarcación intracitoplasmática en células epiteliales glandulares y linfocitos de las placas de Peyer. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (40X).</p>	<p>Figura 25: IHQ en piel de feto n° 7. Inmunomarcación intracitoplasmática color rojo en células de la dermis. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (40X).</p>

	
<p>Figura 26: IHQ en piel de feto n° 7. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en células del músculo liso de los vasos sanguíneos de la dermis. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (40X)</p>	<p>Figura 27: IHQ en riñón feto n° 17. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en células intersticiales. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (40x)</p>
	
<p>Figura 28: IHQ en ganglio linfático, región medular, feto n° 12. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en linfocitos. Ac. Monoclonal 157. Contraste con Hematoxilina (10x).</p>	<p>Figura 29: IHQ en ganglio linfático, región medular. Feto n° 40. Inmunorreactividad intracitoplasmática color rojo en célula de la pared de un vaso sanguíneo. Contraste con Hematoxilina. (40X).</p>

IV.5. Técnica de western blot para medir la especificidad del anticuerpo

La inmunomarcación de las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo 157 contra el genotipo I del vDVB, dilución 1:50, dió como resultado la identificación de bandas

nítidas a nivel de los 53 kDa, entre los estándares de 66,20 kDa (albúmina sérica) y 45 kDa de peso molecular (ovoalbúmina), en las calles donde sembramos el sobrenadante de la cepa NADL y la dilución del purificado de gp53. En las calles donde se sembraron las otras dos cepas (Nebraska y Singer) no se observaron bandas. La dilución 1:100 también evidenció bandas en las mismas calles, pero mucho más tenues. La figura 30 muestra los resultados del western blot, utilizando el anticuerpo diluido 1:50.



IV.6. Comparación de resultados obtenidos con las técnicas de aislamiento viral, IFD e IHQ

IV.6.1. Distribución de frecuencias de resultados obtenidos

La Tabla 13 muestra los resultados obtenidos en las técnicas diagnósticas utilizadas, y la Tabla 14 compara los resultados obtenidos con las técnicas de aislamiento viral, IFD e IHQ en los 50 fetos abortados.

Tabla 13: Resultados obtenidos con aislamiento viral (AV), inmunofluorescencia directa (IFD) e inmunohistoquímica (IHQ) en 50 fetos abortados

Resultados	AV	%	IFD	%	IHQ	%
Positivos	20	40	25	50	26	52
Negativos	30	60	25	50	24	48
Total	50		50		50	

Tabla 14: Comparación de resultados obtenidos por IHQ para la identificación del vDVB en los 50 fetos abortados con los obtenidos con el aislamiento viral y la IFD

	IHQ positiva	IHQ negativa
AV+/IFD+	12	4
AV+/IFD-	2	2
AV-/IFD+	4	5
AV-/IFD-	8	13
Total	26	24

De acuerdo a la Tabla 14, en 12 fetos las tres técnicas diagnósticas utilizadas resultaron positivas (24%), mientras que todas resultaron negativas en 13 fetos (26%). Las tres técnicas concordaron en el 50% de los fetos. La IHQ no detectó 4 fetos que fueron positivos a las otras dos técnicas, mientras que resultaron positivos 8 fetos que fueron negativos con el aislamiento y la IFD, y 12 fetos que fueron negativos con el aislamiento viral.

IV.6.2. Análisis estadístico

La Tabla 15 muestra los valores de Chi-cuadrado y p obtenidas para medir la relación estadística existente entre las técnicas diagnósticas utilizadas.

Tabla 15: Valores de Chi cuadrado y valores de p para comparar las técnicas diagnósticas utilizadas en 50 fetos abortados

Técnicas diagnósticas comparadas	Valor de Chi-cuadrado	Valor de p
Aislamiento viral vs. IFD	12,00	0,0005
Aislamiento viral vs. IHQ	4,33	0,0375
IFD vs. IHQ	2,88	0,08

De acuerdo a los valores obtenidos, existe relación estadística significativa entre los resultados obtenidos entre el aislamiento viral y la IFD, y entre el aislamiento viral y la IHQ, aunque mucho menor. Al comparar los resultados de la IFD con la IHQ, los valores de Chi cuadrado y p demuestran que no existe relación estadística significativa entre ambas técnicas

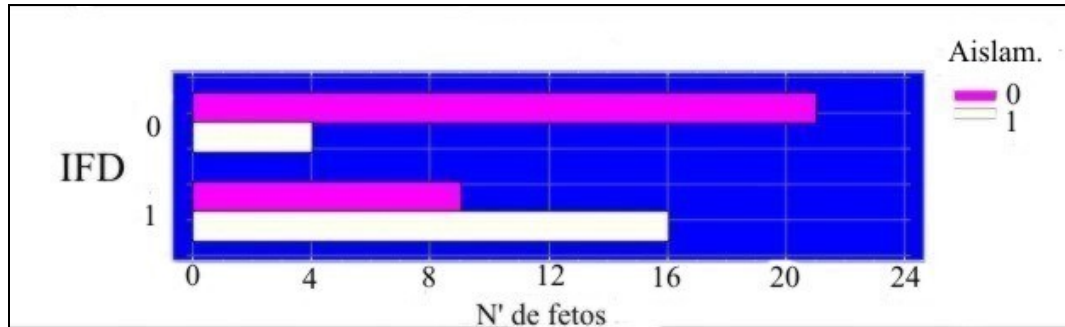
Las Tablas nº 16, 17 y 18, y las figuras 31, 32 y 33 comparan los resultados obtenidos entre las técnicas diagnósticas utilizadas. El aislamiento viral, considerado como el método de referencia, se compara con la Inmunofluorescencia directa y la técnica de Inmunohistoquímica. Por último, se comparan estas últimas técnicas entre si. También se determina para cada comparación, el valor de la concordancia absoluta y el índice kappa

Tabla 16: Tabla de 2x2 : Aislamiento vs. IFD

	<i>Aislamiento negativo</i>	<i>Aislamiento positivo</i>	
<i>IFD negativa</i>	21 42%	4 8%	25 50%
<i>IFD positiva</i>	9 18%	16 32%	25 50%
	30 60%	20 40%	50 100%

Concordancia: 0,74. Índice kappa: 0,48.

Figura 31: Gráfico comparativo entre Aislamiento e IFD



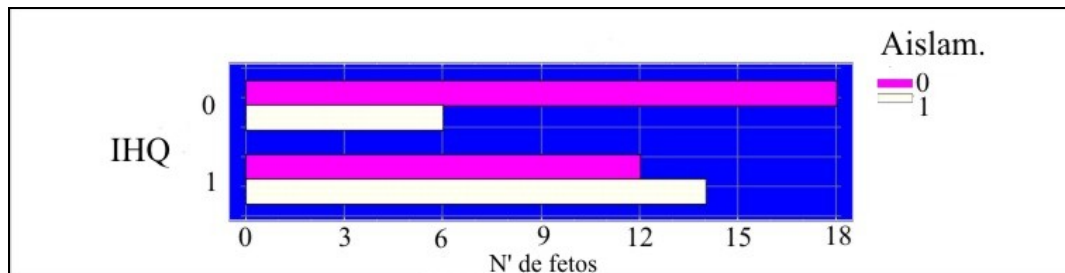
La Tabla 16 y la Figura 31 muestran que en 37 fetos los resultados obtenidos son coincidentes. Sólo 4 fetos con aislamiento viral fueron negativos a la IFD, mientras que 9 fetos sin aislamiento fueron positivos a la misma. El valor del índice kappa muestra una concordancia moderada entre ambas técnicas.

Tabla 17: Tabla de 2x2: Aislamiento vs. IHQ

	<i>Aislamiento negativo</i>	<i>Aislamiento positivo</i>	
<i>IHQ negativa</i>	18 36%	6 12%	24 48%
<i>IHQ positiva</i>	12 24%	14 28%	26 52%
	30 60%	20 40%	50 100%

Concordancia: 0,64. Índice kappa: 0,27

Figura 32: Gráfico comparativo entre Aislamiento e IHQ



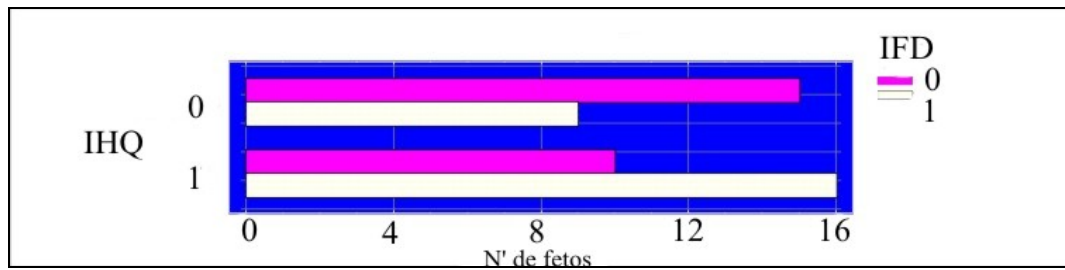
La Tabla 17 y la Figura 32 muestran que hubo concordancia entre los resultados obtenidos con el aislamiento viral y la técnica de IHQ en 32 fetos (18 fetos negativos y 14 fetos positivos a ambas técnicas). La IHQ no detectó 6 fetos con aislamiento viral, y resultó positiva en 12 fetos con aislamiento negativo. El valor de la concordancia y del índice kappa se consideran moderados.

Tabla 18: Tabla de 2x2: IFD vs. IHQ

	<i>IFD negativa</i>	<i>IFD positiva</i>	
<i>IHQ negativa</i>	15 30%	9 18%	24 48%
<i>IHQ positiva</i>	10 20%	16 32%	26 52%
	25 50%	25 50%	50 100%

Concordancia: 0,62. Índice Kappa: 0,24

Figura 33: Gráfico comparativo entre IHQ e IFD



La Tabla 18 y la Figura 33 grafican una concordancia moderada entre las técnicas de IFD e IHQ. El índice kappa resultó bajo. En 31 fetos ambas técnicas fueron coincidentes en los resultados, mientras que 9 fetos positivos a IFD fueron negativos a IHQ y 10 fetos negativos a IFD fueron positivos a IHQ.

V- DISCUSIÓN

V- DISCUSIÓN

V.1. Lesiones histopatológicas en órganos de los 50 fetos abortados y comparación entre los fetos con y sin aislamiento viral

La remisión de fetos completos para necropsia y toma de muestras para diagnóstico siempre ha planteado dificultades difíciles de resolver, tales como el modo de envío y la distancia a recorrer hasta el centro de diagnóstico, que frecuentemente impiden que el material enviado llegue en tiempo y forma al laboratorio. Sumado a estas dificultades, muchas veces los centros de diagnóstico no pueden brindar información certera sobre la causa del aborto, debido a varias razones. Cualquier causa que provoque disturbios en la fisiología normal de la gestación puede interrumpirla, tales como agentes infecciosos, toxinas, desbalances hormonales, vacunaciones, déficits alimentarios, disturbios genéticos e influencias físicas. Además, como el aborto puede sobrevenir por disturbios en la unión feto-placenta o en la salud física de la madre, es muy importante que se envíen todas las muestras consideradas relevantes, con una historia clínica completa. Frecuentemente, el feto muerto y la placenta son retenidos en el útero varios días y sufren autólisis antes de ser expulsados y, en consecuencia, no son adecuados para un estudio diagnóstico completo. Este grado de autólisis siempre ha sido un factor condicionante en el envío del material al laboratorio. Por otra parte, la falta de disponibilidad de las técnicas actuales de diagnóstico en los laboratorios de rutina también entorpece la determinación del diagnóstico etiológico. Esta dificultad ha sido planteada por muchos investigadores: Kirkbride (1992) publicó resultados de la detección de agentes etiológicos en fetos y mortinatos analizados en un período de 10

años, y en el 67,17% de 8.962 materiales no pudo ser determinada la causa del aborto. Alves *et al.* (1996) concluyeron el diagnóstico etiológico en sólo el 31,4% de los 1.019 fetos abortados que analizaron. Campero *et al.* (2003), sobre 354 fetos analizados, no han podido determinar la etiología en el 54,5% de los casos. Costa *et al.* (2004), sobre 273 abortos estudiados, no han determinado la causa en el 64,5% de los casos. Khodakaram-Tafti e Ikede (2005), no pudieron llegar al diagnóstico etiológico en el 59% de los abortos y 32,4% de los nacidos muertos y mortinatos que analizaron, 265 en total.

La necropsia y toma de muestras de los fetos utilizados en la presente investigación fue realizada por docentes y alumnos del Hospital de Salud Animal, en general en forma inmediata a su llegada, para minimizar los efectos negativos de la autólisis. Debido a que las muestras no fueron tomadas por nosotros, en algunos fetos no hemos podido procesar todos los órganos propuestos inicialmente.

Para nuestro conocimiento, no se han documentado muchos trabajos que hayan realizado estudios de lesiones microscópicas en fetos abortados naturalmente (Miller y Quinn, 1975; Jerret *et al.*, 1984; Murray, 1991; Kirkbride, 1992; Moore *et al.*, 2002; Campero *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2004; Al-Afaleq *et al.*, 2006). Muchos trabajos publicados han investigado los efectos que produce el vDVB cuando es inoculado experimentalmente a las madres en distintos estadios de la gestación (Brown *et al.*, 1975; Done *et al.*, 1980; Bielefeldt Ohmann, 1982; Mc Clurkin *et al.*, 1984; Fredriksen *et al.*, 1999 b). También se han investigado las lesiones y la distribución de antígenos virales en animales PI clínicamente normales (Cutlip *et al.*, 1980; Tsuboi e Imada, 1998; Fray *et al.*, 1998; Bielefeldt Ohmann, 1988 a y b; Fredriksen *et al.*, 1999 a; Shin y Acland, 2001; Fray *et al.*, 2000 b; Confer *et al.*, 2005), las lesiones en cuadros

espontáneos o experimentalmente inducidos de enfermedad de las mucosas aguda y crónica (Bielefeldt Ohmann, 1988 a; Wilhelmsen *et al.*, 1991; Liebler-Tenorio *et al.*, 1997; Liebler-Tenorio *et al.*, 2000) y las lesiones y distribución de antígenos virales en animales infectados natural o experimentalmente en la vida post-natal, tanto con el genotipo I como con el II (Wilhelmsen *et al.*, 1991; Spagnuolo-Weaver *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 1998; Odeón *et al.*, 1999; Stoffregen *et al.*, 2000; Baule *et al.*, 2001; Ronchi *et al.*, 2001; Liebler-Tenorio *et al.*, 2002; Liebler-Tenorio *et al.*, 2003; Liebler-Tenorio *et al.*, 2004; Blas-Machado *et al.*, 2004; Khodakaram-Tafti y Miller, 2006).

Teniendo en cuenta los 50 fetos analizados, hemos encontrado lesiones de diferentes grados en todos los fetos. Este hallazgo coincide con las observaciones de Miller y Quinn (1975), que describen lesiones en 48 de los 50 fetos abortados que estudiaron, y en 12 fetos no abortados, obtenidos en frigoríficos. También Kirkbride (1992), Moore *et al.* (2002) y Campero *et al.* (2003) han investigado la presencia de distintos agentes etiológicos en fetos abortados, encontrando lesiones microscópicas en un gran porcentaje de fetos en los que no se halló ningún agente causal.

Por el contrario, Bielefeldt Ohmann (1982) no halló lesiones macro o microscópicas en ninguno de 27 fetos de frigorífico que usó como control, después de corroborar resultados negativos en los exámenes microbiológicos

Campero *et al.* (2003) encontraron que el 28,5% de los casos de abortos no diagnosticados tenían lesiones que hacían presumir un origen infeccioso: las más frecuentes fueron meningoencefalitis, epicarditis, miocarditis, bronconeumonía, neumonía intersticial, hepatitis, nefritis y miositis. En este grupo, no se vieron diferencias significativas entre los casos con y sin lesiones histopatológicas (con lesiones 101, sin lesiones 92). Por ello sugieren que la implementación de técnicas

diagnósticas nuevas o perfeccionadas contribuirían a determinar las causas del aborto infeccioso en casos que no son diagnosticados en el presente.

Algunas de las lesiones que encontramos son consideradas totalmente inespecíficas, como la tumefacción de hepatocitos, la congestión y edema en diversos órganos. También encontramos otras lesiones más específicas, como la depleción linfoidea en timo, bazo, ganglio y válvula ileocecal, que indicarían la presencia de algún agente inmunosupresor, y los infiltrados mononucleares en órganos parenquimatosos, que indicarían la presencia de agentes infecciosos.

En el timo observamos alta frecuencia de depleción linfoidea en ambos grupos de fetos, pero fue mayor en los fetos con aislamiento viral (47% vs. 30%). Bielefeldt Ohmann (1982), que encontró hipoplasia en el timo de 4 fetos inoculados in útero entre los 120 y 165 días de gestación con el vDVB, atribuye la misma a la necrosis y depleción de linfocitos provocada por el virus, ya que observando los cortes con microscopía electrónica, los restos celulares fueron detectados en grandes fagosomas de los macrófagos presentes en las áreas despobladas. Este autor, al igual que Baule *et al.* (2001), también han encontrado en los fetos inoculados experimentalmente, un desarrollo precoz de todos los órganos linfáticos secundarios, sobre todo los ganglios linfáticos y los nódulos linfáticos asociados a los bronquios y al intestino. Estos cambios morfológicos parecen cumplir el patrón de una respuesta inmune primaria: la acumulación de células en tejidos linfáticos periféricos es acompañada de una migración de linfocitos del timo, lo que ocasiona depleción linfoidea en éste órgano. Este hallazgo también coincide con nuestras observaciones, ya que encontramos hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios en el 20% de los fetos positivos, e hiperplasia linfoide en ganglios en el 11% de los mismos.

También en el bazo, los ganglios linfáticos y las placas de Peyer de la válvula ileocecal observamos alta frecuencia de depleción linfoidea en ambos grupos de fetos, pero aún mayor en los fetos positivos. En ganglios linfáticos y bazo, la necrosis linfoidea fue detectada casi exclusivamente en fetos positivos al aislamiento, aunque en válvula ileocecal y timo también observamos esta lesión en fetos negativos. Al-Afaleq *et al.* (2006), también han encontrado depleción linfoidea en ganglios, bazo y timo de mortinatos. Baule *et al.* (2001) hallaron depleción linfoidea en ganglios linfáticos, bazo y placas de Peyer de terneros inoculados experimentalmente, con necrosis de linfocitos en el bazo. Campero *et al.* (2003) encontraron en fetos positivos al vDVB, focos de necrosis en el bazo.

La presencia de células inflamatorias en todos los órganos fue un hallazgo en fetos con y sin aislamiento del virus, aunque en pulmones el porcentaje fue mayor en fetos con aislamiento del vDVB, coincidiendo con los resultados obtenidos por Murray (1991), quien consideró muy consistentes los infiltrados mononucleares peribronquiales e interalveolares en los abortos producidos por el vDVB. Este último autor encontró también lesiones en párpados, y ocasionalmente en miocardio. Baule *et al.* (2001) hallaron neumonía, miocarditis, nefritis e infiltrados inflamatorios focales en el hígado, mientras que Campero *et al.* (2003) observaron neumonía intersticial, nefritis intersticial y hepatitis periportal en fetos con aislamiento de vDVB. Bielefeldt Ohmann (1988) encontró infiltrados ocasionales de células mononucleares en riñones, tríadas portales y músculos de animales infectados persistentes, clínicamente sanos. Cutlip *et al.* (1980) han encontrado lesiones de glomerulonefritis y encefalitis en bovinos PI clínicamente sanos. Wilhelmsen *et al.* (1991) también describieron infiltrados consistentes de linfocitos, plasmocitos y eosinófilos en corteza renal y adrenal, tríadas portales, y

submucosa de la vesícula biliar de animales PI, a los que se les indujo experimentalmente la enfermedad de las mucosas.

En la mucosa de la válvula ileocecal, encontramos necrosis del epitelio en las criptas de Lieberkuhn en el 59% de los fetos con aislamiento, considerada por Brown *et al.* (2007) como una lesión microscópica característica del vDVB. Esta lesión es una de las pocas que presentó diferencia significativa en la frecuencia de presentación entre los fetos positivos y negativos a aislamiento viral. Khodakaram-Tafti y Miller (2006) también han descrito en terneros infectados con el vDVB, ileitis erosiva a ulcerativa, con congestión severa y hemorragia, criptas dilatadas y llenas de mucus, restos celulares y leucocitos, con depleción linfoidea en las placas de Peyer y herniación del epitelio de la mucosa dentro de las placas de Peyer despobladas.

Hemos observado vasculitis en la submucosa de la válvula ileocecal en el 18% de los fetos positivos a aislamiento y en 4% de los negativos. Estos resultados concuerdan con lo descrito por varios autores. Brown *et al.* (2007) han considerado importante en la infección por vDVB la degeneración hialina y la necrosis fibrinoide de las arteriolas de la submucosa mesentérica, con infiltrados mononucleares leves a moderados en las paredes de los vasos y en el área perivascular. Wilhelmsen *et al.* (1991) también hallaron arteritis y periarteritis con necrosis fibrinoide en el intestino. Khodakaram-Tafti y Miller (2006), han encontrado vasculitis fibrinosa en los vasos sanguíneos de la submucosa del ileon, aunque no correlacionadas con la distribución de los antígenos virales. Si bien Brown *et al.* (2007) han descrito lesiones vasculares en una variedad de otros órganos, tales como corazón, cerebro y corteza adrenal, nosotros no las hemos encontrado. Al-Afaleq *et al.* (2006) han encontrado vasculitis en timo y en ganglios linfáticos, en mortinatos y terneros con signología clínica. Por otra parte, Shahriar *et al.*

(2002) han descrito lesiones vasculares más frecuentemente en el corazón que en otros tejidos, y han sugerido que para incrementar la posibilidad de detectar dichas lesiones, deberían examinarse múltiples secciones del corazón y los pulmones.

Con respecto a la autólisis, los resultados que hemos obtenido coinciden con los observados por Kirkbride (1992), que ha manifestado la falta de practicidad que tiene el examen de tejidos en fetos autolíticos, por la dificultad presentada en la interpretación de las observaciones. Aún así, analizamos todos los tejidos y órganos que llegaron al laboratorio, aunque algunos autores han tenido en cuenta las lesiones macroscópicas y el grado de autólisis para decidir el posterior análisis microscópico de los tejidos (Kirkbride, 1992; Campero *et al.*, 2003).

De las 6 placentas que fueron remitidas al laboratorio, sólo encontramos lesiones en una de ellas. Si bien el número analizado es escaso, teniendo en cuenta la cantidad de fetos recibidos, el hallazgo de lesiones en sólo una coincide con el porcentaje de placentitis (5%) hallado por Kirkbride (1992), sobre un número mayor de fetos y mortinatos. Murray (1991) también encontró lesiones en placenta, la mayoría inespecíficas. Otros autores concluyeron que después de la infección del feto con el vDVB, no se encuentran lesiones en la placenta, y si se observan, éstas son insignificantes (Kendrick, 1971; Done *et al.*, 1980).

A través del análisis estadístico podemos concluir que las lesiones que muestran diferencia significativa en la frecuencia de aparición en fetos positivos y negativos al aislamiento viral son la necrosis linfoidea en ganglio linfático, la necrosis del epitelio de la mucosa de la válvula ileocecal, y la depleción y necrosis linfoidea en placas de Peyer de la válvula, consideradas todas por Brown *et al.* (2007) como características o distintivas en DVB.

Las lesiones observadas, si bien pueden orientar hacia un diagnóstico presuntivo, no pueden asegurarlo, ya que como observamos, muchas de las consideradas distintivas de vDVB, también fueron encontradas en fetos negativos al aislamiento. Si bien cabe la posibilidad de que algunos fetos negativos sean falsos negativos, el aislamiento viral es considerada en la actualidad la técnica gold standard, y su especificidad no puede ser comparada con el análisis histopatológico, que no presenta lesiones patognomónicas. También es posible que los fetos negativos estén afectados por otros agentes inmunosupresores que provocan similares respuestas en los tejidos a la infección por vDVB. Esta conclusión es coincidente con la de Murray (1991), que estableció que las lesiones observadas en los fetos son insuficientes para determinar la causa primaria del aborto. También en terneros seronegativos inoculados experimentalmente con el genotipo II, se encontraron muy pocos cambios macroscópicos e histológicos, y los autores concluyeron que en el examen postmortem la causa no pudo hacerse evidente; mas aún, se encontraron lesiones que no hubieran sido asociadas al vDVB (Ellis *et al.*, 1998).

V.2. Recuperación Antigénica

Uno de los aspectos cruciales de la IHQ es la retención de los antígenos en los tejidos en una conformación que puedan ser reconocidos por los anticuerpos. Como hemos mencionado, la reactividad de muchos antígenos es alterada por la fijación. Durante las últimas tres décadas, la IHQ se ha transformado en el método auxiliar mas importante para la histopatología. Sin embargo, la estandarización de estas técnicas continúa siendo un problema. La calidad de la inmunomarcación depende

principalmente de tres factores: 1) fijación y procesamiento de los tejidos; 2) desenmascaramiento de los determinantes antigénicos; y 3) sensibilidad de los sistemas de detección (Werner, 1999).

El formaldehído induce la formación de uniones cruzadas entre proteínas, o entre proteínas y ácidos nucleicos, ocasionando el enmascaramiento de muchos determinantes antigénicos (Werner, 1999). Por otra parte, el efecto de la deshidratación y la temperatura de inclusión en parafina, también pueden afectar la conformación o estabilidad de los antígenos tisulares (Haines y Chelack, 1991).

Los determinantes antigénicos que han sido ocultados o alterados por el formaldehído pueden ser desenmascarados, recuperando su conformación. Como hemos mencionado, los métodos más comunes utilizados para esto, son los tratamientos proteolíticos o los basados en la utilización de métodos físicos como el calor o ultrasonido (Gimeno *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2001).

Nuestros resultados en relación a las desventajas del tratamiento con horno microondas, y las ventajas de la Proteinasa K, coinciden con trabajos previos de Lértora *et al.* (2003), quienes trabajaron con muestras fijadas por corto tiempo en formol. Shi *et al.* (2001) han considerado que en algunas proteínas, los tratamientos de alta temperatura (como el microondas en nuestro caso) puede inducir una reacción negativa en la IHQ, lo que coincide con nuestros hallazgos.

En trabajos previos, otros autores han realizado pruebas similares. Belák *et al.* (1989) realizaron la inmunodetección de antígenos del vDVB sobre tejidos fijados en alcohol mediante tres anticuerpos monoclonales en alta concentración (1:5). Allan *et al.* (1989) realizaron por primera vez la detección de antígenos en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina, utilizando tratamientos con tripsina, pepsina y proteasa XIV

para desenmascarar los antígenos, y tuvieron resultados parecidos al comparar los resultados obtenidos en parafina con los alcanzados con inmunofluorescencia directa sobre criosecciones. En este sentido, como ya hemos mencionado, la mayoría de los trabajos en este tema han sido realizados sobre materiales procesados por congelación (Wilhelmsen *et al.*, 1991; Liebler-Tenorio *et al.*, 1997; Spagnuolo-Weaver *et al.*, 1997; Fredriksen *et al.*, 1999 a y b; Liebler-Tenorio *et al.*, 2000; Fray *et al.*, 1998; Fray *et al.*, 2000 a; Liebler-Tenorio *et al.*, 2003; Liebler-Tenorio *et al.*, 2004). La IHQ realizada en estas condiciones, haría inviable la técnica para el diagnóstico de rutina en condiciones de trabajo "a campo".

Para realizar la técnica de IHQ, utilizamos dos anticuerpos primarios, para cada uno de los genotipos del virus. Para el genotipo 1 usamos el anticuerpo elaborado en la línea celular 157 (VMRD ® Cat No. 157), dirigido contra la proteína E2 (gp 53) del genotipo I del vDVB. Para el genotipo 2, utilizamos el anticuerpo elaborado en la línea celular BA-29 (VMRD ® Cat. No. BA-29), dirigido contra la proteína E2 (gp 53) del genotipo 2 del vDVB. El anticuerpo monoclonal 157 fue producido y caracterizado por Deregt *et al.* (1990), junto con otros 3 anticuerpos, todos específicamente dirigidos contra la proteína E2. El anticuerpo monoclonal BA-29, contra la proteína E2 del genotipo II, fue producido y caracterizado más recientemente (Deregt *et al.*, 1998 b). La reactividad del mismo fue medida con 20 cepas y aislamientos de vDVB genotipo II de brotes en enfermedad severa de Ontario y Estados Unidos y reconoció todas las cepas con las que se enfrentó para caracterizarlo, indicando una alta conservación de epitopes entre virus del genotipo II.

Para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que muestra resultados positivos en tejidos fetales fijados en formol, embebidos en parafina y sometidos a IHQ

con la utilización del anticuerpo monoclonal 157 contra la glicoproteína E2 (gp 53) del genotipo I del vDVB. Los resultados que hemos obtenido no concuerdan con los alcanzados por Haines *et al.* (1992), quienes probaron 32 anticuerpos monoclonales, dirigidos contra las proteínas virales NS2-3 (p125), NS3 (p80), E^{ms} (gp 48) y E2 (gp53), incluido el 157, y obtuvieron resultados positivos sólo con el anticuerpo 15c5, dirigido contra la proteína E^{ms} (gp 48) del virus. También Evermann *et al.* (1993) tuvieron inmunomarcación en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina con este solo anticuerpo, de cuatro que utilizaron. Si bien Haines *et al.* (1992), al igual que Moennig (1990) han establecido que la dificultad de la detección del vDVB en tejidos fijados en formol se debe a los cambios conformacionales que sufren algunos epitopes del virus por los efectos desnaturalizantes de la fijación, existe evidencia que algunos epitopes resisten éstos efectos y pueden ser detectados (Allan *et al.*, 1989). Haines *et al.* (1992) concluyeron que la proteína E^{ms} resiste los efectos de la fijación formólica o éstos son revertidos con el tratamiento enzimático. Sin embargo, estos autores también utilizaron otros anticuerpos dirigidos contra esta proteína, sin obtener resultados positivos.

También se han publicado trabajos donde se utilizaron anticuerpos monoclonales contra la gp 53 (E2) en células de cultivo celular o en tejidos cortados con crióstato, y el anticuerpo 15c5 en el material fijado en formol y embebido en parafina (Njaa *et al.*, 2000; Swasdipan *et al.*, 2001; Ridpath *et al.*, 2002).

Lértora *et al.* (2003) probaron sobre biopsias de piel el anticuerpo 15c5 y un panel de anticuerpos monoclonales, WB160, WB 162, WB 210 y WB 215, y coincidieron con Haines *et al.* (1992) en los resultados obtenidos, ya que la mejor inmunomarcación se logró con el anticuerpo 15c5, luego de la recuperación antigénica. Estos autores obtuvieron una reacción débilmente positiva con el anticuerpo WB 210, dirigido contra

la proteína E^{ns}, que mejoró con el tratamiento en horno microondas al 50% de potencia, pero su utilización no fue estandarizada porque, según recomendaciones del fabricante, debe ser usado en pool para detectar todas las posibles variables antigénicas.

En nuestra investigación, utilizamos sólo el anticuerpo monoclonal 157 para detectar el genotipo I del vDVB, y si bien el fabricante también recomienda utilizarlo en pool (Deregt *et al.*, 1990 y 1994), hemos tenido buenos resultados aún cuando la tinción en los tejidos fetales nunca fue masiva. El anticuerpo monoclonal 157 es una inmunoglobulina G2a, que ha demostrado ser de alta habilidad neutralizante, de fuerte avidéz por el antígeno viral, de alta especificidad y de amplia reactividad cruzada, reaccionando con distintas cepas, no citopáticas y citopáticas, de aislamientos realizados en diferentes localizaciones geográficas, tanto de Norteamérica como de Europa, indicando que varias cepas de vDVB tienen epitopes comunes. Hubo una sola cepa del genotipo 1 del vDVB no detectada en el estudio realizado por Deregt *et al.* (1990), llamada cepa Draper. A través de un estudio con gp 53 con el extremo carboxilo terminal cortado, se ha determinado que el anticuerpo monoclonal 157 se une a su epitope dentro de los primeros 192 aminoácidos de la proteína (Deregt *et al.*, 1998 a). Si bien la glicoproteína E2 (gp 53) está codificada por un sector del genoma viral que es altamente variable, el mismo autor publicó en un trabajo posterior, que el anticuerpo monoclonal 157 demostró reactividad cruzada entre aislamientos de vDVB del 88,4% (84 de 95 aislamientos), y no reaccionó con cepas de CSFv, a diferencia de los anticuerpos contra las proteínas NS2-3 y NS3, que si lo hicieron (Deregt *et al.*, 1994). Yu *et al.* (1994) por otra parte, realizaron análisis de secuenciamiento genético y demostraron que la glicoproteína E2 (gp53) de las cepas Singer, NADL y SD-1 muestran gran homología tanto a nivel del RNA codificante como a nivel de los

aminoácidos que forman la proteína. En todas las secuencias fueron detectados 19 residuos de cisteína y 5 sitios potenciales de glicosilación N-ligados. Por lo tanto, concluyeron que si bien la homología a nivel de la secuencia nucleotídica puede variar, hay una fuerte conservación estructural de las proteínas de envoltura entre cepas de vDVB. Moennig (1990) también ha remarcado que a pesar de ser bien conocido el potencial de los virus ARN de cadena simple de experimentar cambios genéticos rápidos, los antígenos de los pestivirus están remarcablemente bien conservados.

Mediante la técnica de western blot que hemos realizado para corroborar la especificidad del anticuerpo, ya demostrada por Deregt *et al.* (1990), hemos obtenido bandas de la glicoproteína E2 (gp53) con la cepa de referencia NADL y con la dilución de la proteína purificada. No obtuvimos bandas en las calles donde sembramos la cepa Nebraska. El resultado negativo en la técnica de Western blot podría deberse a la desnaturalización de los epitopes con los procedimientos a que son sometidas las proteínas antes de la corrida electroforética. También Kreutz *et al.* (2000) no pudieron reconocer las proteínas gp53 y gp25 por western blot con los anticuerpos por ellos desarrollados, sugiriendo que poseen epitopes dependientes de la conformación. En un trabajo realizado por Köhl *et al.* (2007), las proteínas virales fueron sometidas a separación electroforética en ausencia de agentes reductores, y de esta manera la glicoproteína E2 (gp53) mantuvo su forma dimérica y pudo ser reconocida por los anticuerpos después de ser inmovilizadas por transferencia en la membrana. Las bandas marcadas a la altura del peso molecular de 53 kDa que hemos obtenido en las calles donde sembramos la cepa NADL y una dilución de la proteína purificada, concuerda con los hallazgos de Deregt *et al.* (1990), que tuvieron bandas con todos los anticuerpos contra gp 53 utilizados. En un estudio posterior realizado con virus mutantes, se ha

establecido que el epitope al que está dirigido el anticuerpo 157 es discontinuo, en contraste con lo que había indicado la reactividad del anticuerpo en el western blot. Una posible explicación a la positividad obtenida en esta técnica, es que durante los procedimientos que se realizan durante el western blot pueden producirse repliegues en la estructura de la E2 nativa (Deregt *et al.*, 1998 a).

Si bien la gran mayoría de los trabajos realizados en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina utilizaron el anticuerpo 15c5 para detectar el vDVB (Haines *et al.*, 1992; Evermann *et al.*, 1993; Ellis *et al.*, 1995; Thür *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 1998; Grooms *et al.*, 1998; Odeón *et al.*, 1999; Stoffregen *et al.*, 2000; Shin y Acland, 2001; Njaa *et al.*, 2000; Ridpath *et al.*, 2002; Lértora *et al.*, 2003; Cornish *et al.*, 2005; Khodakaram-Tafti y Miller, 2006), en la actualidad no está disponible comercialmente para ser utilizado en inmunohistoquímica sobre tejidos, y es utilizado en la elaboración de un ELISA de captura de antígenos para realizar diagnósticos sobre muestras de piel de oreja.

Unos pocos trabajos utilizaron en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina otro anticuerpo monoclonal contra E^{tns} (gp48), denominado 3.12F1, con muy buenos resultados (Blas Machado *et al.*, 2004; Confer *et al.*, 2005; Fulton *et al.*, 2006). Kreutz *et al.* (2000), produjeron y caracterizaron dos anticuerpos monoclonales, el denominado 3.1C4, dirigido contra la proteína E2 (gp53) y el llamado 6.F11, dirigido contra la proteína E1 (gp 25), a partir de aislamientos realizados en Brasil, que eran antigénicamente diferentes de las cepas de referencia de Norteamérica. El anticuerpo 3.1C4 fue capaz de reconocer todos los aislamientos de vDVB a los que se enfrentó, tanto del genotipo 1 como del 2 (22 cepas de virus aislados en Brasil, 10 cepas de Argentina, y 7 cepas de referencia de Estados Unidos, tales como NADL, Singer,

Oregón, BVDV 890, VS-253, NY-93 y VS-191). Por este hallazgo, los autores concluyeron que el anticuerpo se une a un epítipo altamente conservado dentro de E2. Cuando ambos anticuerpos producidos fueron probados en tejidos formolados y embebidos en parafina, utilizando el anticuerpo 15c5 como control positivo, fallaron en detectar inmunorreactividad, aún realizando tratamiento de recuperación antigénica con proteasa XIV.

V.3. Inmunohistoquímica en órganos de fetos abortados para la identificación de antígenos del virus de la Diarrea Viral Bovina.

De los 50 fetos procesados, encontramos en 26 fetos inmunorreactividad con el anticuerpo 157, específico para el genotipo I del vDVB. Ninguno de los materiales presentó inmunorreactividad con el anticuerpo BA-29, específico para el genotipo II. Si bien no hemos encontrado el genotipo 2 en las muestras procesadas, varios trabajos anteriores confirman la presencia del mismo en nuestro país (Odeón *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2001; Odeón *et al.*, 2003). Incluso el genotipo II fue asociado a abortos en hembras preñadas (Stoffregen *et al.*, 2000), y aislado de fetos abortados y de suero fetal (Ridpath *et al.*, 1994), así como también de fetos no abortados (Jones *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2000), pero no hemos encontrado trabajos publicados de casos de aborto producidos por el genotipo II del vDVB en Argentina.

Los órganos que tuvieron mayor frecuencia de inmunomarcación fueron los ganglios linfáticos, el bazo y la válvula ileocecal. Celedón *et al.* (1997), también hallaron una distribución desigual de antígenos virales en distintos órganos procedentes del mismo animal, y concluyeron que el virus no se distribuye en forma homogénea, encontrándose

mas diseminado en tejidos asociados con el sistema retículo-endotelial. En la válvula ileocecal, se observaron inmunomarcadas las células epiteliales de las criptas y células mononucleares de la lámina propia y de las placas de Peyer. Estos hallazgos coinciden con los de Belák *et al.* (1989) y Haines *et al.* (1992), que hallaron inmunomarcación en las mismas células de cortes de intestino de animales enfermos de DVB y EM. Bielefeldt Ohmann (1988 a) ha encontrado en terneros PI clínicamente sanos y en animales con enfermedad de las mucosas una amplia distribución de antígenos virales en células epiteliales del intestino, así como también en monocitos y linfocitos T de la sangre y en macrófagos y linfocitos T del tejido linfático.

En el presente estudio encontramos inmunorreacción en las células del músculo liso de los vasos sanguíneos de la submucosa del intestino y de la dermis. Este hallazgo ha sido encontrado por otros autores, en los órganos fetales y en el endometrio del útero de vaquillonas PI (Fredriksen *et al.*, 1999 a), en fetos abortados y mortinatos (Ellis *et al.*, 1995), en terneros PI (Shin y Acland, 2001) y en terneros inoculados experimentalmente (Ellis *et al.*, 1998).

En los pulmones se observaron algunas células del epitelio bronquial y alveolar inmunomarcadas, además de algunos macrófagos en el tejido intersticial. Este hallazgo coincide con los resultados de Confer *et al.* (2005), que estudiaron la distribución de antígenos virales en el tracto respiratorio de animales PI, y encontraron antígenos virales en células epiteliales de revestimiento y glandulares, macrófagos, células del músculo liso de los vasos sanguíneos y células nerviosas. También encontraron antígenos virales en gran cantidad en células pericondriales y condrocitos. La visualización de antígenos virales en hepatocitos y células de Kupffer coincide con el trabajo de Shin y Acland (2001), que encontraron, entre otras, las mismas células

inmunomarcadas en tejidos de animales PI. Fredriksen *et al.* (1999 b), que estudiaron la distribución de antígenos del vDVB en tejidos maternos y fetales en distintos estadios después de la infección aguda experimental, observaron los primeros antígenos virales en hígado y en pulmones fetales a los 14 días post-infección, sin detectar los mismos en la placenta materna.

El patrón de tinción que obtuvimos en todos los cortes nunca ha sido masivo, sino que se encontraban focos de células inmunomarcadas, a diferencia de los resultados obtenidos por Haines *et al.* (1992), en distintos órganos de animales enfermos y Lértora *et al.* (2003), en cortes de piel de animales PI, donde el patrón de tinción fue más diseminado. Khodakaram-Tafti y Miller (2006) describieron diferentes resultados en las células del intestino de terneros infectados: la tinción de las células epiteliales de las criptas del intestino fue inconsistente, mientras que en los macrófagos, células linfoides, células del músculo liso de los vasos y células endoteliales observaron una reacción muy intensa. En el presente trabajo, el patrón de tinción obtenido puede deberse a la utilización de un único anticuerpo, dirigido contra un epítipo de la glicoproteína E2 (Gp 53), que puede haber sido dañada irreversiblemente por la fijación formólica (Moennig, 1990), o puede haber sufrido cambios en su estructura primaria debido a mutaciones en el genoma viral, que impiden ser detectada por el anticuerpo en todos los tejidos. A pesar de ello, pudimos reconocer antígenos virales, probablemente porque la recuperación antigénica pudo revertir los efectos de la fijación formólica. Confer *et al.* (2005), por otra parte, desestimaron la pérdida de antigenicidad producida por la exposición prolongada al formol, ya que encontraron mayor número de células inmunomarcadas y distribuidas más diseminadamente en tejidos de terneros PI que permanecieron 7 días en el fijador que en tejidos que permanecieron 3 días; y mas bien

consideraron que esta variación puede haberse producido por diferencias en el tropismo del virus o en la madurez de las células. Estos autores realizaron recuperación antigénica con pronasa, y utilizaron el anticuerpo monoclonal contra gp 48, denominado 3.12F1, como anticuerpo primario, e incubaron luego con dos anticuerpos más: uno secundario y uno terciario. Elahi *et al.* (1997), por otra parte, estudiaron el efecto de la fijación con acetona y con formol en células infectadas para realizar pruebas de anticuerpos unidos a peroxidasa, y concluyeron que la fijación formólica es superior, ya que todos los epitopes de los aislamientos y las cepas fueron reconocidos por 17 de los 19 anticuerpos utilizados, (9 dirigidos contra la gp53, 5 contra gp48 y 5 contra p125-80), mientras que cuando se utilizó acetona, se detectó mayor variabilidad en la detección de las cepas enfrentadas con los anticuerpos. Estos autores también demostraron un alto grado de conservación de estas tres proteínas virales, ya que emplearon 13 aislamientos del vDVB de Québec, 2 cepas aisladas en Estados Unidos, y 4 cepas de referencia.

V.4. Comparación de resultados obtenidos con las técnicas de aislamiento viral, IFD e IHQ

El 50% de los fetos analizados en el presente trabajo tuvieron concordancia entre las tres técnicas diagnósticas utilizadas. La técnica de IHQ no detectó 4 fetos que resultaron positivos por las otras dos técnicas. Estos resultados son bajos comparados con los obtenidos por Ellis *et al.* (1995), que compararon las mismas técnicas diagnósticas que las realizadas por nosotros en 105 muestras de tejidos fetales y de mortinatos, y obtuvieron un 74% de concordancia entre las tres, mientras que la IHQ

resultó negativa en un solo caso de aislamiento viral e IFD positivas. Consideramos que una posible explicación a la mayor sensibilidad de la IHQ obtenida por ellos es debida al uso del anticuerpo 15c5, que probablemente detectó antígenos virales resistentes a la fijación formólica y altamente conservados.

Comparando los resultados obtenidos entre el aislamiento viral y la IFD a partir de los cultivos celulares, el valor de concordancia absoluta fue alto, y el valor del índice kappa se considera moderado. Los valores de χ^2 y p indican una asociación significativa entre los resultados obtenidos con ambas técnicas, lo que era esperable, ya que la IFD fue realizada a partir del cultivo celular.

Comparando los resultados obtenidos por aislamiento viral e IHQ, observamos que la concordancia fue moderada, y el índice kappa bajo. Sin embargo, los valores de χ^2 y p nos indican una asociación significativa entre ambos resultados. Encontramos 6 fetos positivos a aislamiento viral que resultaron negativos con la técnica de IHQ. Esta diferencia puede deberse a que el anticuerpo que utilizamos no haya reconocido la glicoproteína E2 (gp 53) del virus aislado, por posibles mutaciones que se hayan producido en el genoma codificante, o a que la proteína viral se haya modificado en forma irreversible debido a la fijación formólica, aunque se haya practicado la recuperación antigénica. En los resultados publicados por Haines *et al.* (1992), no hubo inmunomarcación en ninguna muestra utilizando el anticuerpo 157, aunque el método de recuperación antigénica utilizado fue diferente. Por otro lado, 12 fetos negativos a aislamiento mostraron inmunomarcación en diversos órganos (fetos nº 5, 8, 10, 11, 17, 22, 29, 33, 34, 35, 45 y 48). Estas diferencias pueden deberse a que muchos de ellos presentaban diferentes grados de autólisis, de leve a severa, y la técnica de IHQ permite detectar antígenos virales aún en muestras autolíticas, mientras que el

aislamiento viral requiere la presencia de virus infeccioso en las muestras, tal como lo manifiestan diversos autores (Haines *et al.*, 1992; Ellis *et al.*, 1995 y Spagnuolo-Weaver *et al.*, 1997).

En última instancia, cuando comparamos los resultados obtenidos con las técnicas de IFD e IHQ, si bien la concordancia absoluta fue moderada, el valor bajo del índice kappa y de χ^2 , junto al valor de p mayor de 0,05, nos indican que los resultados obtenidos entre ambas técnicas no están relacionados. Según Ellis *et al.* (1995), la técnica de IFD es la de más baja sensibilidad, lo que resulta en alto número de falsos positivos y negativos, aunque estos investigadores practicaron la técnica sobre tejidos congelados, en muchos casos autolíticos, mientras que nosotros realizamos la IFD como un método de identificación del virus aislado a partir de los cultivos celulares inoculados con los pools de órganos fetales enviados al laboratorio.

VI- CONCLUSIONES

VI- CONCLUSIONES

1- Los fetos con aislamiento positivo del vDVB mostraron asociación significativa con las lesiones de necrosis linfoidea en ganglios linfáticos, necrosis del epitelio de la mucosa en la válvula ileo-cecal y depleción y necrosis linfoidea en placas de Peyer de la válvula ileocecal. Las lesiones observadas en fetos abortados permiten inferir la participación de un agente infeccioso e inmunosupresor.

2- La digestión enzimática de los tejidos fetales formolados ha demostrado ser efectiva para la recuperación de antígenos virales, incluso de aquellos que son epitopes dependientes de la conformación, como la glicoproteína de envoltura E2 (gp53). Los mejores resultados se obtuvieron con la proteinasa K.

3- La IHQ es una técnica que puede realizarse sobre muestras de fetos abortados, sobre todo por la simplicidad en cuanto a la remisión de las muestras y los resultados que pueden brindarse. Además, a pesar de que los tejidos y órganos fetales se encuentran frecuentemente autolíticos, los antígenos virales pueden ser reconocidos en las células.

4- El anticuerpo monoclonal 157, dirigido contra la glicoproteína E2 del genotipo I del vDVB, ha demostrado ser de utilidad para identificar el virus en tejidos de fetos fijados en formol.

5- Los órganos linfáticos fueron los que presentaron mayor inmunorreactividad con el anticuerpo monoclonal 157 dirigido contra el genotipo I del vDVB. La inmunorreacción fue focal en todos los tejidos analizados.

6- Encontramos una buena concordancia entre los resultados obtenidos con el aislamiento viral y la IFD, y moderada entre el aislamiento y la IHQ para el diagnóstico de la Diarrea Viral Bovina.

7- El aislamiento y la identificación del vDVB en órganos fetales demuestran que este agente es una causa importante de abortos bovinos en la Cuenca lechera Santafesina.

VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPOV, E.V.; MURRAY, C.L.; FROLOV, I.; QU, L.; MYERS, T.M.; RICE, CH. M. 2004. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.*, 78: 2414-2425.
- AGNELLO, V.; ÁBEL, G.; ELFAHAL, M.; KNIGHT, G.B.; ZHANG, Q.X. 1999. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 12776-12771.
- AL-AFALEQ, A.I.; HEGAZY, A.A.; ABU ELZEIN, E.M.E.; AL- BISHR, B.A. 2006. Clínico-pathological Studies on Bovine Virus Diarrhoea (BVD) in Eastern Saudi Arabia. *Sc. J. King F. Univ.*, 7: 155-170.
- ALLAN, G.M.; MC NULTY, M.S.; BRYSON, D.; MACKIE, D.; PLATTEN, M.1989. Demonstration of bovine virus diarrhoea virus antigen in formalin fixed, paraffin embedded tissue using a streptavidin/biotin technique. *Res. Vet. Sci*, 46: 416-418.
- ALVES, D.; MC. EWEN, B.; MURRAY, H.; MAXIE, G.; ANDERSON, N. 1996. Trends in bovine abortions submitted to the Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 1993-1995. *Can. Vet. J.*, 37: 287-288.
- ANSARI, I.H.; CHEN, L.M.; LIANG, D; GIL, L.H.; ZHONG, W.; DONIS, R.O. 2004. Involvement of a bovine viral diarrhoea virus NS5B locus in virion assembly. *J. Virol*, 78: 9612-9623.
- BAKER, J.C., 1987. Bovine viral diarrhoea virus. *JAVMA*, 190, 11: 1449-1458.
- BAKER, J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clín. North. Am. Food Anim. Pract.*, 11: 425-445.

BAULE, C.; KULCSÁR, G.; BÉLAK, K.; ALBERT, M.; MITTELHOLZER, C.; SOÓS, T.; KUCSERA, L.; BÉLAK, S. 2001. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type I. *J. Clín. Microb.*, 39: 146-153.

BECHER, P.; ORLICH, M.; THIEL, H.J. 2001. RNA Recombination between Persisting Pestivirus and a Vaccine Strain: Generation of Cytopathogenic Virus and Induction of Lethal Disease. *J. Virol.*, 75: 6256-6264.

BELÁK, K.; GIMENO, E.J.; BELÁK, S. 1989. Demonstration of Bovine Viral diarrhoea virus antigens in cell cultures and in paraffin-embedded tissue sections by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique using monoclonal antibodies. *Act. Vet. Scand.*, 30: 231-233.

BIELEFELDT OHMANN, H. 1982. Experimental Fetal Infection with Bovine Viral Diarrhoea Virus II. Morphological Reactions and Distribution of Viral Antigen. *Can. J. Com. Med.*, 46: 363-369.

BIELEFELDT OHMANN, H. 1988 a. In situ Characterization of Mononuclear Leukocytes in Skin and Digestive Tract of Persistently Bovine Viral Diarrhoea Virus-infected Clinically Healthy Calves and Calves with Mucosal Disease. *Vet. Pathol.*, 25: 304-309.

BIELEFELDT OHMANN, H. 1988 b. BVD Virus Antigens in Tissues of Persistently Viraemic, Clinically Normal Cattle: Implications for the Pathogenesis of Clinically Fatal Disease. *Acta vet. Scand.*, 29: 77-84.

BIELEFELDT OHMANN, H. 1995. The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. A window on the pathogenesis. *Vet. Clín. North. Am. Food Anim. Pract.*, 11: 447-476.

- BITSCH, V.; HANSEN, K.-E.L.; RONSHOLT, L. 2000. Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994-1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Vet. Microb.*, 77: 137-143.
- BLAS MACHADO, U.; SALIKI, J.T.; DUFFY, J.C.; CASELTINE, S.L. 2004. Bovine Viral Diarrhea Virus Type 2-Induced Meningoencephalitis in a heifer. *Vet. Pathol.*, 41: 190-194.
- BOLIN, S.R. 1995. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. *Vet. Clín. North. Am. Food Anim. Pract.*, 11: 615-625.
- BOLIN, S.R.; MC. CLURKIN, A.W. 1985. Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 2385- 2387.
- BOLIN, S.R.; MC. CLURKIN, A.W.; CUTLIP, R.C.; CORIA, M.F. 1985. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 573-576.
- BOLIN, S.R.; MOENNIG, V.; KELSO GOURLEY, N.E.; RIDPATH, J.F. 1988. Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups. *Arch. Virol.*, 99: 117-124.
- BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. 1998. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10: 135-139.
- BRAUN, R.K.; OSBURN, B.I.; KEBDRICK, J.W. 1973. Immunologic response of bovine fetus to bovine viral diarrhoea virus. *Am. J.Vet.Res.*, 34: 1127-1132.

- BRAUN, U.; SCHÖNMANN, M.; EHRENSPERGER, M.; HILBE, M.; STRASSER, M. 1999. Intrauterine Infection with Bovine Virus Diarrhoea Virus on Alpine Communal Pastures in Switzerland. *J. Vet. Med*, 46: 13-17.
- BROCK, K.V.; DENG, R.; RIBLET, S.M. 1992. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR. *J. Virol. Meth.*, 38: 39-46.
- BROCK, K.V.; GROOMS, D.L.; RIDPATH, J.; BOLIN, S.R. 1998. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10: 22-26.
- BROES, A.; WELLEMANS, G.; DHEEDENE, J. 1992. Syndrome hémorragique chez des bovines infectés par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD/MD). *Ann. Méd. Vet.*, 137: 33-38.
- BROWN, C.C.; BAKER, D.C.; BARKER, I.K. 2007. Diarrea Viral Bovina en Jubb, Kennedy y Palmer's. *Pathology of Domestic Animals*, Fifth edition. Volume 2. M. Grant Maxie: págs. 140-147.
- BROWN, T.T.; BISTNER, S.I.; DE LAHUNTA, A.; SCOTT, F.W.; MC ENTEE, K. 1975. Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhoea virus. II. Ocular lesions. *Vet. Pathol.*, 12: 394-404.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J. 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.*, 114: 535-536.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C. J.; POCOCK, D. H. 1986. Mucosal Disease: The dilemma of experimental disease. In *Proceedings Volume 1 of the 14th. World Congress on Diseases of Cattle*. Edited by Hartigan, P.J. and Monaghan, M.L. Dublin: World Association for Buiatrics. Págs 199-203.

- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C. J.; POCOCK, D. H. 1987. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rech. Vét.*, 18: 157-166.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J.1989. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci.*, 46: 307-311.
- BROWNLIE, J. 1990 a. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech.*, 9: 43-59.
- BROWNLIE, J. 1990 b. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microb.*, 23: 371-382.
- CAMPERO, C.M.; ODRIOZOLA, E.; ODEÓN, A.C.; CASARO, A.P. 1994. The causes of abortion and death occurring in calves during their first week of life in the south east of Buenos Aires province, Argentina. VII International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Conference Program and Proceedings, Buenos Aires, 8-11 Nov, p. 104.
- CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; ODEÓN, A.C.; CIPOLLA, A.L.; ODRIOZOLA, E. 2003. Aetiology of Bovine Abortion in Argentina. *Vet. Res. Com.*, 27: 359-369.
- CARMAN, S.; VAN DREUMEL, T.; RIDPATH, J.; HAZLETT, M.; ALVES, D.; DUBOVI, E.; TREMBLAY, R.; BOLIN, S.; GODKIN, A.; ANDERSON, N. 1998. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *J. Vet. Diagn. Inv.*, 10: 27-35.
- CARRILLO, B.J.; ZURBRIGGEN, M.A.; UROZ, I.C.; SCHUDEL, A.A. 1986. Epidemiological survey of some viral diseases of cattle in the province of Corrientes, Argentina. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 5,30: 731-742.

- CELEDON, M.O.; ROCO, L.; QUINTEROS, G.; SANTIBAÑEZ, M.; BERRIOS, P. 1997. Puesta en evidencia del virus diarrea viral bovina en bovinos clínicamente afectados. Arch. Med. Vet.,23: 189-195.
- CHEN, J.; LI, Z.; HEW, CH-L. 2007. Characterization of a novel envelope protein WSV010 of shrimp white spot syndrome virus and its interaction with a major viral structural protein VP24. Virol., 364: 208-213.
- CHILDS, T. 1946. X Disease of Cattle- Saskatchewan. Can. J. Comp. Med., X, 11: 316-319.
- COGGINS, L.; GILLESPIE, J.H.; ROBSON, D.S.; THOMPSON, J.D. ; PHILLIPS, W.V. ; WAGNER, W.C.; BAKER, J. A. 1961. Attenuation of virus diarrhea virus (Strain Oregon C24V) for vaccine purposes. Cornell Vet., 51: 539-545.
- COLLETT, M.S.; ANDERSON, D.K.; RETZEL, E. 1988 a. Comparison of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the Flaviviridae. J. Gen. Virol., 69: 2637-2643.
- COLLETT, M.S.; LARSON, R.; BELZER, S.K.; RETZEL, E. 1988 b. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. Virol., 165: 200-208.
- COLLETT, M.S.; LARSON, R.; GOLD, C.; STRICK, D.; ANDERSON, D.K.; PURCHIO, A.F. 1988 c. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. Virol, 165: 191-199.
- COLLETT, M.S.; MOENNIG, V.; HORZINEK, M.C. 1989. Review Article. Recent Advances in Pestivirus Research. J. Gen. Virol., 70: 253-266.
- COLLETT, M.S.; WISKERCHEN, M.; WELNIAK, E.; BELZER, S.K. 1991. Bovine viral diarrhea virus genomic organization. Arch. Virol. Suppl., 3: 19-27.

- COLLETT, M.S. 1992. Molecular genetics of pestiviruses. *Comp. Imm. Microb. And Inf. Dis.*, 15: 145-154.
- COLLINS, M.E.; DESPORT, M.; BROWNLIE, J. 1999. Bovine viral Diarrhea Virus Quasispecies during Persistent Infection. *Virology*, 259: 85-98.
- CONFER, A.W.; FULTON, R.W.; STEP, D.L.; JOHNSON, B.J.; RIDPATH, J.F. 2005. Viral Antigen Distribution in the Respiratory Tract of Cattle Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus Subtype 2a. *Vet. Pathol.*, 42: 192-199.
- COONS, A.H. 1971. The development of immunohistochemistry. *Ann. NY Acad. Sci.*, 177: 5-9.
- CORAPI, W.V.; DONIS, R.O; DUBOVI, E.J. 1988. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections. *J. Virology*, 62: 2823-2827.
- CORAPI, W.V.; FRENCH, T.W.; DUBOVI, E.J. 1989. Severe Thrombocytopenia in Young Calves Experimentally Infected with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus. *J. Virology*, 63: 3934-3943.
- CORAPI, W.V.; ELLIOT, R.D.; FRENCH, T.W.; ARTHUR, D.G.; BEZEK, D.M.; DUBOVI, E.J. 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 196: 590-596.
- CORNISH, T.E.; VAN OLPHEN, A.L.; CAVENDER, J.L.; EDWARDS, J.M.; JAEGER, P.T.; VIEYRA, L.L.; WOODARD, L.F.; MILLER, D.R.; O'TOOLE, D. 2005. Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17: 110-117.

COSTA, E.F.; FAZZIO, L.E.; TRAVERÍA, G.E.; SÁNCHEZ,R.O.; ALVARADO PINEDO, M.F.; MATTIOLI, G.A.; OTERO, M.M.; CHIALVA, M.; ROMERO, J.R. 2004. Causas de mortalidad y aborto en bovinos. Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la Provincia de Buenos Aires. Rev. Med. Vet.,85: 16-22.

CUTLIP, R. C; MC CLURKIN, A.W.; CORIA, M.F.1980. Lesions in Clinically Healthy Cattle Persistently Infected with the Virus of Bovine Viral Diarrhea-Glomerulonephritis and Encephalitis. Am. J. Vet. Res., 41: 1938-1941.

DARBYSHIRE, J.H. 1962. Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of cattle II. A serological relationship between mucosal disease and swine fever. Res. Vet. Sci., 3: 125-128.

DEREGT, D.; MASRI, S.A.; CHO, H.J.; BIELEFELDT OHMANN, H. 1990. Monoclonal Antibodies to the p80/ 125 and gp53 Proteins of Bovine Viral Diarrhea Virus: Their Potential Use as Diagnostic Reagents. Can. J. Vet. Res., 54: 343-348.

DEREGT, D.; BOLIN, S. R.; HECKERT, R.A.; LOEWEN, K.G. 1994. Monoclonal Antibodies to Bovine Viral Diarrhea Virus: Cross-reactivities to Field Isolates and Hog Cholera Virus Strains. Can. J. Vet. Res., 58: 71-74.

DEREGT, D.; LOEWEN, K.G. 1995. Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. Can. Vet. J., 36: 371-377.

DEREGT, D.; PRINS, S. 1998. A monoclonal Antibody-Based Immunoperoxidase Monolayer (Micro-Isolation) Assay for Detection of Type 1 and Type 2 Bovine Viral Diarrhea Viruses. Can. J. Vet. Res., 62: 152-155.

DEREGT, D.; BOLIN, S. R.; VAN DEN HURK, J.; RIDPATH, J. F.; GILBERT, S. A. 1998 a. Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp 53)

protein of bovine viral diarrhea virus with neutralization escape mutants. *Virus Res.*, 53: 81-90.

DEREGT, D.; VAN RIJN, P. A.; WIENS, T. Y.; VAN DEN HURK, J. 1998 b. Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhea virus define three antigenic domains involved in neutralization. *Virus Research*, 57: 171-181.

DONE, J.T.; TERLECKI, S.; RICHARDSON, C.; HARKNESS, J.W.; SANDS, J.J.; PATTERSON, D.S.; SWEASEY, K.; SHAW, I.G.; WINKLER, C.E.; DUFFELL, S.J. 1980. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet. Rec.*, 106: 473-479.

DONIS, R.O.; DUBOVI, E.J. 1987 a. Characterization of Bovine Viral Diarrhoea-Mucosal Disease Virus-specific Proteins in Bovine Cells. *J. Gen. Virol.*, 68: 1597-1605.

DONIS, R.O.; DUBOVI, E.J. 1987 b. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. *Virol.*, 158: 168-173.

DONIS, R.O.; CORAPI, W.; DUBOVI, E.J. 1988. Neutralizing Monoclonal Antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus Bind to the 56K to 58K Glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, 69: 77-86.

DONIS, R.O. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet. Clín. North. Am. Food An. Pract.*, 11: 393-423.

DONOFRIO, G.; BOTTARELLI, E.; SANDRO, C.; FLAMMINI, C.F. 2006. Expresión of Bovine Viral Diarrhoea Virus Glycoprotein E2 as a Soluble Secreted Form in a Mammalian Cell Line. *Clin. Vacc. Immunol.*, 13: 698-701.

- DUBOVI, E.J. 1994. Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle. *Vet. Clín. North. Am. Food Anim. Pract.*, 10: 503-514.
- DUBOVI, E.J. 1996. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet. Med.*, 91: 867-872.
- DUFELL, S.J.; HARKNESS, J.W. 1985. Bovine virus diarrhea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.*, 117: 240-245.
- EDWARDS, S. 1990. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. Sci. Tech.*, 9: 115-130.
- ELAHI, S.M.; HARPIN, S.; CORNAGLIA, E.; TALBOT, B.; ELAZHARY, Y. 1997. Antigenic Variation Among Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Strains and the Role of Different Cell Fixation Methods in Immunoassays. *Can. J. Vet. Res.*, 61: 34-38.
- ELBERS, K.; TAUTZ, N.; BECHER, P.; STOLL, D.; RÜMENAPF, T.; THIEL, H.J. 1996. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.*, 70: 4131-4135.
- ELLIS, J.A.; MARTIN, K.M.; NORMAN, G.R.; HAINES, D.M. 1995. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhea virus in bovine abortions and neonatal death. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 433-436.
- ELLIS, J.A.; WEST, K.H.; CORTESE, V.S.; MYERS, S.L.; CARMAN, S.; MARTIN, K.M.; HAINES, D.M. 1998. Lesions and Distribution of Viral Antigen Following an Experimental Infection of Young Seronegative Calves with Virulent Bovine Virus Diarrhea Virus-Type II. *Can. J. Vet. Res.*, 62: 161-169.
- EVERMANN, J.F.; BERRY, E.S.; BASZLER, T.V.; LEWIS, T.L.; BYINGTON, T.C.; DILBECK, P. M. 1993. Diagnostic approaches for the detection of bovine viral diarrhea (BVD) virus and related pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 265-269.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) Red de cooperación técnica ONU. 1988. Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico.
- FETZER, C.; TEWS, B.A.; MEYERS, G. 2005. The carboxy-terminal sequence of the pestivirus glycoprotein e(gns) represents an unusual type of membrane anchor. *J. Virol*, 79: 11901-11913.
- FLORES, E.F.; GIL, L.H.; BOTTON, S.A.; WEIBLEN, R.; RIDPATH, J.F.; KREUTZ, L.C.; PILATI, C.; DRIEMEYER, D.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A.C. 2000. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet. Microbiol.* 77: 175-183.
- FRAY, M.D.; PRENTICE, H.; CLARKE, M.C.; CHARLESTON, B. 1998. Immunohistochemical Evidence for the Localization of Bovine Viral Diarrhoea Virus, a Single Stranded RNA Virus, in Ovarian Oocytes in the Cow. *Vet. Pathol*, 35: 253-259.
- FRAY, M.D.; MANN, G.E.; CLARKE, M.C.; CHARLESTON, B. 2000 a. Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in the cow. *Vet. Microb.*, 77: 185-194
- FRAY, M.D.; SUPPLE, E. A.; MORRISON, W. I.; CHARLESTON, B. 2000 b. Germinal centre localization of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected animals. *J. of Gen. Virol.*, 81: 1669- 1673.
- FREDRIKSEN, B; PRESS, C.M.; LOKEN, T., ODEGAARD, S.A., 1999 a. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microb.*, 64: 109-122.
- FREDRIKSEN, B.; PRESS, C. M.; SANDVIK, T.; ODEGAARD, S.A.; LOKEN, T. 1999 b. Detection of Viral Antigen in Placenta and Fetus of Cattle Acutely Infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Vet. Pathol.*, 36: 267-275.

FRITZEMEIER, J.; HAAS, L.; LIEBLER, E.; MOENNIG, V.; GREISER-WILKE, I. 1997. The development of early vs. Late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. Arch. Virol., 142: 1335-1350.

FULTON, R.W.; SALIKI, J.T.; BURGE, L.J.; D'OFFAY, J.M.; BOLIN, S.R.; MAES, R.K.; BAKER, J.C.; FREY, M.L. 1997. Neutralizing antibodies to Type 1 and 2 bovine viral diarrhea viruses: detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. Cl. Diagn. Lab. Imm., 4: 380-383.

FULTON, R.W.; SALIKI, J.T.; CONFER, A.W.; BURGE, L.J.; D'OFFAY, J.M.; HELMAN, R.G.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; PAYTON, M.E. 2000. Bovine viral diarrhea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. J. Vet. Diagn. Invest., 12: 33-38.

FULTON, R.W.; RIDPATH, J.F.; SALIKI, J.T.; BRIGGS, R.E.; CONFER, A.W.; BURGE, L. J.; PURDY, C.W.; LOAN, R.W.; DUFF, G.; PAYTON, M.E. 2002. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. Can. J. Vet. Res., 66: 181-190.

FULTON, R.W.; BRIGGS, R.E.; RIDPATH, J.F.; SALIKI, J.T.; CONFER, A.W.; PAYTON, M.E.; DUFF, G.C.; STEP, D.L.; WALKER, D.A. 2005. Transmission of Bovine viral diarrhea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. Can. J. Vet. Res., 69: 161-169.

FULTON, R.W.; JOHNSON, B.J.; BRIGGS, R.E.; RIDPATH, J.F.; SALIKI, J.T.; CONFER, A.W.; BURGE, L.J.; STEP, D.L.; WALKER, D.A.; PAYTON, M.E. 2006. Challenge with Bovine viral diarrhea virus by exposure to persistently infected calves:

protection by vaccination and negative results of antigen testing in nonvaccinated acutely infected calves. *Can. J. Vet. Res.*, 70: 121-127.

GILLESPIE, J.H.; BAKER, J.A.; MC ENTEE, K. 1960. A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet.* , 50: 73-79.

GIMENO, E.J.; MASSONE, A.R.; PORTIANSKY, E.L. 1998. Preembedding epitope retrieval. *Ap. Immunohistochem.* 6: 35-41.

GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A.; DYKSTRA, C.C.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; SULLIVAN, E.; ROBL, J.; KASINATHAN, P.; KUMAR, A.;BOYKIN, D.W. 2004. Prevention and elimination of bovine viral diarrhea virus infections in fetal fibroblast cells. *Antiv. Res.*, 64: 113-118.

GLEW, E.J.; CARR, B.V.; BRACKENBURY, L.S.; HOPE, J.C.; CHARLESTON, B.; HOWARD, C.J. 2003. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *J. Gen. Virol.*, 84: 1771-1780.

GOENS, D. 2002. The evolution of bovine viral diarrhea: a review. *Can. Vet. J.*, 43: 946-954.

GOLLAN, A.; CHIMENO ZOTH, S.A.; PICCONE, M.E.; MARIÑO, B.; PERALTA, C.; RODRÍGUEZ ARMESTO, R.; OCCHI, H. 2006. Aislamiento y caracterización del virus de la diarrea viral bovina en un ternero con síndrome purpúrico. *Arch. Med.Vet.*, 38: 167-173.

GONG, Y.; TROWBRIDGE, R.; MACNAUGHTON, T.B.; WESTAWAY, E.G.; SHANNON, A.D.; GOWANS, E.J. 1996. Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.*, 77: 2729-2736.

- GRASSMANN, C.W.; ISKEN, O.; BEHRENS, S.E. 1999. Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhoea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *J. Virol.*, 73: 9196-9205.
- GRIFFIN, S.D.; BEALES, L.P.; CLARKE, D.S.; WORSFOLD, O.; EVANS, S.D.; JAEGER, J.; HARRIS, M.P.; ROWLANDS, D.J. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*, 535,1-3: 34-38.
- GROOMS, D. L.; BROCK, K. V.; PATE, J. L.; DAY, M. L. 1998 a. Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology*, 49: 595-605.
- GROOMS, D.L.; BROCK, K.V.; WARD, L.A. 1998 b. Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10: 125-129.
- GROOMS, D.L.; KEILEN, E. 2002. Screening of Neonatal Calves for Persistent Infection with Bovine Viral Diarrhoea Virus by Immunohistochemistry on Skin Biopsy Samples. *Clinical and Diagn.Labor.Immunology*, 9: 898-900.
- GRUMMER, B.; BEER, M.; LIEBLER-TENORIO, E.; GREISER-WILKE, I. 2001. Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.*, 82: 2597- 2605.
- HAINES, D.M.; CHELACK, B.J. 1991. Review Article. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues form diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 3: 101-112.

- HAINES, D.M.; CLARK, E.; DUBOVI, E.J. 1992. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus in formalin-fixed, paraffin embedded tissues. *Vet. Pathol.*, 29: 27-32.
- HARADA, T.; TAUTZ, N.; THIEL, H. J. 2000. E2-p7 region of the Bovine viral Diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J. Virol.*, 74: 9498-9506.
- HEIMANN, M.; ROMAN-SOSA, G.; MARTOGLIO, B.; JÜRGEN-THIEL, H.; RÜMENAPF, T. 2006. Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J. Virol.*, 80: 1915-1921.
- HERNÁNDEZ SAMPIERI, R.; FERNANDEZ COLLADO, C.; BAPTISTA LUCIO, P. 2000. Metodología de la Investigación. Segunda edición. Mc. Graw- Hill. México. 501 págs.
- HIETALA, S.K.; CROSSLEY, B.M. 2005. Virus replication, págs. 81 a 90. En: *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management y Control*. Goyal, S.M. y Ridpath, J.F. (Eds.). Blackwell Publishing, 261 págs.
- HOUE, 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clín. North. Am. Food Anim. Pract.*, 11: 521-547.
- HOUE, H.1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.*, 64: 89-107.
- IQBAL, M.; FLICK SMITH, H.; MC. CAULEY, J.W. 2000. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. *J. Gen. Virol.*, 81: 451-459.
- JAYASHI, F.C.; GAVIDIA, C.C.; ARAINGA, R.M.; MANCHEGO, S.A., RIVERA, G.H. 2005. Dinámica de seroconversión en hembras bovinas post eliminación de animales portadores del virus de la diarrea viral bovina. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 16: 56-64.

- JERRET, I.V.; MC ORIST, S.; WADDINGTON, J.; BROWNING, J.W.; MALECKI, J.C.; MC. CAUSLAND, I.P. 1984. Diagnostic studies of the fetus, placenta and maternal blood from 265 bovine abortions. *Cornell Vet.*, 74: 8-20.
- JOHNSON, D. W.; MUSCOPLAT, C.C. 1973. Immunologic abnormalities in calves with chronic bovine viral diarrhea. *Am. J. Vet. Res.*, 34: 1139-1141.
- JONES, L.R.; ZANDOMENI, R.; WEBER, E.L. 2001. Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from Argentina. *Vet. Microb.*, 81: 367-375.
- JUBB, K.V.P.; KENNEDY, P.C. 1963. *Pathology of Domestic Animals*. 1st. Ed., vol. 2. New York: Academic Pr.:12-21.
- KATZ, J. B.; LUDEMANN, L.; PEMBERTON, J.; SCHMERR, M.J. 1987. Detection of bovine virus diarrhea virus in cell culture using an immunoperoxidase technique. *Vet. Microb.*, 13: 153-157.
- KENDRICK, J.W. 1971. Bovine viral diarrhea-mucosal disease virus infection in pregnant cows. *Am. J. Vet. Res.*, 32: 533-544.
- KHODAKARAM-TAFTI, A.; IKEDE, B. O. 2005. A retrospective study of sporadic bovine abortions, stillbirths, and neonatal abnormalities in Atlantic Canada, from 1990 to 2001. *Can. Vet. J.*, 46: 635-637.
- KHODAKARAM-TAFTI, A.; MILLER, L. 2006. The comparative evaluation of cellular localization of viral antigens with microscopic changes in the ileum of cattle infected with bovine viral diarrhea. *Comp. Clín. Pathol.*, 15: 90-93.
- KIRKBRIDE, C. 1992. Etiologic agents detected in a 10 years study of bovine abortions and stillbirths. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4: 175-180.
- KOBRAK, A.; WEBER, E.L. (1997). Bovine Diarrhea Virus: an update. *Rev. Argent. Microbiol.* 29: 47-61.

- KÖHL, W.; ZIMMER, G.; GREISER-WILKE, I.; HAAS, L.; MOENNIG, V.; HERRIER, G. 2004. The surface glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus contains an intracellular localization signal. *J. Gen. Virol.*, 85: 1101-1111.
- KÖHL, W.; GRÖNE, A.; MOENNIG, V.; HERRLER, G. 2007. Expression of the surface glycoprotein E2 of Bovine viral diarrhea virus by recombinant vesicular stomatitis virus. *J. Gen. Virol.*, 88: 157-165.
- KREUTZ, L.C.; DONIS, R.; GIL, L.H.V.; LIMA, M.; HOFFMAN, A.N.; GARCEZ, D.C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. 2000. Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhea virus. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33: 1459-1466.
- KREY, T.; THIEL, H.J.; RÜMENAPF, T. 2005. Acid resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *J. Virol.*, 79: 4191-4200.
- KUMMERER, B.M.; MEYERS, G. 2000. Correlation between Point Mutations in NS2 and the Viability and Cytopathogenicity of Bovine Viral Diarrhea Virus Strain Oregon Analyzed with an Infectious cDNA Clone. *J. Virol.*, 74: 390-400.
- LACKNER, T.; MÜLLER, A.; PANKRAZ, A.; BECHER, P.; THIEL, H.J.; GORBALENYA, A.E.; TAUTZ, N. 2004. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J. Virol.*, 78,19: 10765-10775.
- LAMBERT, G.; FERNELIUS, A.L. 1968. Bovine viral diarrhoea virus and *Escherichia coli* in neonatal calf enteritis. *Can. J. Comp. Med.*, 32: 440-446.
- LANGEDIJK, J.P.; VAN VEELLEN, P.A.; SCHASPER, W.M.; DE RU, A.H.; MELOEN, R.H.; HULST, M.M. 2002. A structural model of pestivirus E(rns) based on disulfide bond connectivity and homology modeling reveals an extremely rare vicinal disulfide. *J. Virol.*, 76: 10383-10392.

- LECOT, S.; BELOUZARD, S.; DUBUISSON, J.; ROUILLÉ, Y. 2005. Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.*, 79: 10826-10829.
- LEE, K.M.; GILLESPIE, J.H. 1957. Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.*, 18: 952-953.
- LERTORA, W. J. 2003. Diarrea viral bovina: actualización. *Rev. Vet.*, 14: 42-51.
- LERTORA, J.; PAREDES, E.; REINHARDT, G.; ALBERDI, A. 2003. Inmunohistoquímica en biopsias de piel tratadas con proteínasa K y microondas para el diagnóstico en animales persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina. *Arch. Med. Vet.*, 35: 23-36.
- LIANG, D.; FERNÁNDEZ SAINZ, I.; ANSARI, I.H.; GIL, L.H.V.G.; VASSILEV, V.; DONIS, R.O. 2003. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestivirus. *J. Gen. Virol.*, 84: 1269-1274.
- LIEBLER- TENORIO, E.M.; GREISER-WILKE, I.; POHLENZ, J.F.1997. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Arch. Virol.*,142: 1613-1634.
- LIEBLER-TENORIO, E.M.; LANWEHR, A.; GREISER-WILKE,I.; LOEHR, B.I.; POHLENZ, J. 2000. Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. *Vet. Microb.*, 77: 163-174.
- LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.E.; NELLY, J.D. 2002. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral diarrhea virus type 2 in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 63: 1575-1584.

LIEBLER- TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.E.; NEILL, J.D. 2003. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15: 221-232.

LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D. 2004. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 16: 388-396.

LINDBERG, A. 2002. Epidemiology and Eradication of Bovine Viral Diarrhoea Virus Infections. Studies on transmission and prenatal diagnosis of persistent infection. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*, 132.

LINDBERG, A.; HOUE, H. 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med.*, 72: 55-73.

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.J.; RICE, CH.M. 2007. Flaviviridae: the viruses and their replication, p.1101-1152. En: *Fields Virology*, 5ta. Edición. Knipe, D.M. y Howley, P.M. (Eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

MC CLURKIN, A.W.; CORIA, M.F.; CUTLIP, R.C. 1979. Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 174: 1116-1119.

MC CLURKIN, A.W.; LITTLEDIKE, E.T.; CUTLIP, R.C.; FRANK, G.H.; CORIA, M.F.; BOLIN, S.R. 1984. Production of cattle immunotolerant to Bovine Viral Diarrhea Virus. *Can. J. Comp. Med.*, 48: 156-161.

MC CLURKIN, A.W.; BOLIN, S.R.;CORIA, M.F. 1985. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 186: 568-569.

- MAKOSCHEY, B.; BECHER, P.; JANSSEN, M. G.; ORLICH, M.; THIEL, H.J.; LÜTTICKEN, D. 2004. Bovine viral diarrhoea virus with deletions in the 5'-nontranslated region: reduction of replication in calves and induction of protective immunity. *Vaccine*, 22(25-26): 3285-3294.
- MALMQUIST, W.A. 1968. Bovine viral diarrhoea-mucosal disease: Etiology, pathogenesis, and applied immunity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 763-768.
- MAURER, K.; KREY, T.; MOENNIG, V.; THIEL, H.J.; RÜMENAPF, T. 2004. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.*, 78: 1792-1799.
- MENDEZ, E.; RUGGLI, N.; COLLETT, M.S.; RICE, C.M. 1998. Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J. Virol.*, 72: 4737-4745.
- MEYLING, A.; HOUE, H.; JENSEN, A.M. 1990. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 9: 75-93.
- MEYER, C.; VON FREYBURG, M.; ELBERS, K.; MEYERS, G. 2002. Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhoea viruses from infectious cDNA clones. *J. Virol.*, 76: 8494-8503.
- MEYERS, G.; TAUTZ, N.; STARK, R.; BROWNLIE, J.; DUBOVI, E.J.; COLLETT, M.S.; THIEL, H.J. 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *J. Virol.*, 191: 368-386.
- MEYERS, G.; TAUTZ, N.; BECHER, P.; THIEL, H.J.; KÜMMERER, B.M. 1996. Recovery of Cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.*, 70: 8606-8613.
- MEYERS, G.; THIEL, H.J. 1996. Molecular characterization of pestivirus. *Adv. Virus Res.*, 47: 53-117.

- MEYERS, G.; EGE, A.; FETZER, C.; VON FREYBURG, M.; ELBERS, K.; CARR, V.; PRENTICE, H.; CHARLESTON, B.; SCHÜRMANN, E.M. 2007. Bovine Viral Diarrhea Virus: Prevention of Persistent Fetal Infection by a Combination of Two Mutations Affecting E^{ns} RNAse and N^{pro} Protease. *J. Virol.*, 81: 3327-3338.
- MILLER, R. B.; QUINN, P. J. 1975. Observations on abortions in cattle: a comparison of pathological, microbiological and immunological findings in aborted fetuses and fetuses collected at abattoirs. *Can. J. Comp. Med.*, 39: 270-290.
- MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. 1990. Hepatitis C virus shares aminoacid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 2057-2061.
- MOENNIG, V.1990. Pestiviruses: a review. *Vet. Microb.*, 23(1-4): 35-54.
- MOENNIG, V.; LIESS, V. 1995. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clín. North. Am. Food Anim. Pract.*, 11: 477-487.
- MOORE, D.P.; MORREL, E.; SERNIA, C.; SCICCITANO, S.; ALMEIJEIRAS, J.; CARRIN, D.; POGGIO, A.C.; ODEÓN, A.C.; CIPOLLA, A.L.; PAOLICCHI, F.A.; ODRIOZOLA, E.; CAMPERO, C.M. 2002. Diagnóstico de muerte fetal y perinatal en bovinos. XIVa. Reunión anual de la AAVLD (Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico), 13-15 de noviembre del 2002, Villa General Belgrano, Sierras de Córdoba.
- MOORE, D.P.; CAMPERO, C.M.; ODEÓN, A.C.; BARDÓN, J.C.; SILVA-PAULO, P.; PAOLICCHI, F.A.; CIPOLLA, A.L. 2003. Humoral immune response to infectious agents in aborted bovine fetuses in Argentina. *Rev. Arg. Microb.*, 35: 143-148.

- MORÁN, P.; DI SANTO, M.; GOGORZA, L. 2006. Transmisión del virus de la diarrea viral bovina. Factores de riesgo en el ingreso y diseminación en los rodeos. *Rev. Vet.*, 17: 50-56.
- MUÑOZ, D.P.; LAGER, I.A.; MERSICH, S.; ZÁBAL, O.; ULLOA, E.; SCHUDEL, A.A.; WEBER, E.L. 1996. Foetal infections with bovine viral diarrhoea virus in Argentina. *Br. Vet. J.*, 152, 2: 175-182.
- MUÑOZ-ZANZI, C. A.; JOHNSON, W.O.; THURMOND, M.C.; HIETALA, S. K. 2000. Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12: 195-203.
- MUÑOZ-ZANZI, C.; THURMOND, M.C.; HIETALA, S. K. 2004. Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy heifers. *Theriogenology*, 61, 6: 1085-1099.
- MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M.J. 1999. *Veterinary Virology*. Third edition. Academic Press. 555-569. 629 págs.
- MURRAY, R.D. 1991. Lesions in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. *Arch. Virol*, 3: 217-224.
- NAGAI, M.; SATO, M.; NAGANO, H.; PANG, H.; KONG, X.; MURAKAMI, T.; OSAWA, T.; AKASHI, H. 1998. Nucleotide sequence homology to bovine viral diarrhoea virus 2 (BVDV2) in the 5' untranslated region of BVDVs from cattle with mucosal disease or persistent infection in Japan. *Vet. Microbiol.*, 60: 271-276.
- NAGAI, M.; SAKODA, Y.; MORI, M.; HAYASHI, M.; KIDA, H.; AKASHI, H. 2003. Insertion of cellular sequence and RNA recombination in the structural protein coding region of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.*, 84: 447-452.

- NEILL, J. D.; RIDPATH, J. F. 2001. Recombination with a cellular mRNA encoding a novel DnaJ protein results in biotype conversion in genotype 2 bovine viral diarrhea viruses. *Virus Research*, 79: 59-69.
- NISKANEN, R.; LINDBERG, A.; TRAVÉN, M. 2002. Failure to spread bovine virus diarrhoea virus infection from primarily infected calves despite concurrent infection with bovine coronavirus. *Vet. J.*, 163: 251-259.
- NISKANEN, R.; LINDBERG, A. 2003. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *Vet. J.*, 165: 125-130.
- NJAA, B.L.; CLARK, E.G.; JANZEN, E.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M. 2000. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J.Vet. Diagn. Invest.*, 12: 393-399.
- OCCHI, H.; ALENIUS, S.; SCORTTI, M.; DEICAS, F.; SANTIROCO, B.; DAFFNER, J. 1991. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD) en pool de leche en rodeos de la cuenca lechera santafesina. XII Reunión de Sociedad Argentina de Virología. Buenos Aires, Argentina.
- ODEÓN, A.C.; KAISER, G.G.; DONIS, R.O.; RISATTI, G.; LEUNDA, M.R. 1998. Aislamiento y análisis molecular del virus de la diarrea viral bovina genotipo II en Argentina. In: *Proceedings of the XII Reunión Científico Técnica; As. Arg. Vet. Lab. Diagn.* 12, 94.
- ODEÓN, A. C.; KELLING, C. L.; MARSHALL, D.J.; ESTELA, E.S.; DUBOVI, E. J.; DONIS, R.O. 1999. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhea virus genotype II (NY-93). *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11: 221-228.

ODEÓN, A. C.; SPATH, E. J. A.; PALOMA, E.G.; LEUNDA, M.R.; FERNÁNDEZ SAINZ, I.J.; PÉREZ, S.E.; KAISER, G. G.; DRAGHI, M.G.; CETRA, B.M.; CANO, A. 2001. Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina. *Rev. Med. Vet.*, 82: 216-220.

ODEON, A.C.; RISATTI, G.; KAISER, G.G.; LEUNDA, M.R.; ODRIOZOLA, E.; CAMPERO, C.M.; DONIS, R.O. 2003. Bovine viral diarrhoea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Vet. Microb.*, 96: 133-144.

OLAFSON, P.; MAC CALLUM, A.D.; FOX, A. 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, 36: 205-213.

ORTEGA, H.H.; LORENTE, J.A.; MIRA, G.A.; BARAVALLE, C.; SALVETTI, N.R. 2004. Constant light exposure cause dissociation in gonadotrophins secretion and inhibits partially neuroendocrine differentiation of Leydig cells in adult rats. *Reprod. Dom. Anim.*, 39: 417-423.

PATON, D.J. 1995. Pestivirus diversity. *J. Comp. Pathol.*, 112: 215-236.

PELLERÍN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TIJSSEN, P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 203: 260-268.

PETERS, W.; GREISER-WILKE, I.; MOENNIG, V.; LIESS, B. 1986. Preliminary serological characterization of bovine viral diarrhoea virus strains using monoclonal antibodies. *Vet. Microb.*, 12: 195-200.

PINTO, G.B.; HAWKES, P.; ZÁBAL, O.; ULLOA, E.; LAGER, I.A.; WEBER, E.L.; SCHUDEL, A.A. 1993. Viral antibodies in bovine fetuses in Argentina. *Res. Vet. Sci.*, 55: 385-388.

- POCOCK, D.H.; HOWARD, C.J.; CLARKE, M.C.; BROWNLIE, J. 1987. Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhea virus. *Arch. Virol.*, 94: 43-53.
- POOLE, T.L.; WANG, C.; POPP, R.A.; POTGIETER, L.N.D.; SIDDIQUI, A.; COLLETT, M.S. 1995. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virol.*, 206: 750-754.
- POTGIETER, L.; Mc. CRACKEN, M.D.; HOPKINS, F.M.; GUY, J.S. 1985. Comparison of pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 151-153.
- POTGIETER, L. 1995. Immunology of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clín. North. Am. Food. An. Pract.*, 11: 501-520.
- PURCHIO, A.F.; LARSON, R.; COLLETT, M.S. 1983. Characterization of Virus-Specific RNA synthesized in Bovine cells infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.*, 48: 320-324.
- PURCHIO, A.F.; LARSON, R.; COLLETT, M.S. 1984 a. Characterization of Bovine Viral diarrhea virus proteins. *J. Virol.*, 50: 666-669.
- PURCHIO, A.F.; LARSON, R.; TORBORG, LL.; COLLETT, M.S. 1984 b. Cell-free translation of bovine viral diarrhea virus RNA. *J. Virol.*, 52: 973-975.
- RADOSTITS, O.M.; LITTLEJOHNS, I.R. 1988. New concepts in the Pathogénesis, Diagnosis and Control of Diseases Caused by the Bovine Viral Diarrhea Virus. *Can. Vet. J.*, 29: 513-528.
- RAMSEY, F.K.; CHIVERS, W. H. 1953. Mucosal disease of cattle. *North. Am. Vet.*, 34: 629-634.

- REBHUN, W.C.; FRENCH, T.W.; PERDRIZET, J.A.; DUBOVI, E.J.; DILL, S.G.; KARCHER, L.F. 1989. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 3: 42-46.
- REINHARDT, G.; CARRASCO, L.; TADICH, N.; RIEDEMANN, S. 2001. Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para diarrea viral bovina (DVB) en 50 predios de la X región, Chile. Seroneutralización y enzimoimmunoensayo indirecto (I-ELISA). *Arch. Med. Vet.* 33: 173-183.
- REINHARDT, G.; OCHOA, C. A.; TADICH, N.; RIEDEMANN, S. 2003. Utilización del método de Elisa en la detección directa de antígeno de virus diarrea viral bovina en muestras de suero sanguíneo de bovinos. *Arch. Med. Vet.*, 35: 89-93.
- RENARD, A.; SCHMETZ, D.; GUIOT, C.; SHIMMER, S.; DAGENAIS, L.; PASTORET, P.P.; DINA, D.; MARTIAL, J.A. 1987. Molecular cloning of the bovine viral diarrhea virus genomic RNA. *Ann. Rech. Vet.*, 18: 121-125.
- RICHER, L.; MAROIS, P.; LAMONTAGNE, L. 1988. Association of bovine viral diarrhea virus with multiple viral infections in bovine respiratory disease outbreaks. *Can. Vet. J.*, 29: 713-717.
- RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. 1991. Antigenic and genomic comparison between non-cytopathic and cytopathic bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle that had spontaneous mucosal disease. *J. Gen. Virol.* 72, 725-729.
- RIDPATH, J.F.; LEWIS, T.L.; BOLIN, S.R.; BERRY, E.S. 1991. Antigenic and genomic comparison between non-cytopathic and cytopathic bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle that had spontaneous mucosal disease. *J. Gen. Virol.*, 72: 725-729.

- RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E.J.1994. Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes. *Viol.*, 205: 66-74.
- RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. 1995. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Viol.*, 212: 39-46.
- RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. 1998. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol. Cel. Probes.* 12: 101-106.
- RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D. 2000. Detection and Characterization of Genetic Recombination in Cytopathic Type 2 Bovine Viral Diarrhea Viruses. *J. Of Virol.*, 74, 18: 8771-8774.
- RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; FREY, M.; LANDGRAF, J. G. 2000. Phylogenetic antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North América. *Vet. Microbiol.*, 77: 145-155.
- RIDPATH, J.F.; HIETALA, S.K.; SORDEN, S.; NEILL, J.D. 2002. Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhea infections. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 14: 303-307.
- RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; VILCEK, S.; DUBOVI, E.; CARMAN, S. 2006. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet. Microb.*, 114: 196-204.
- RONCHI, J. I.; ESTELA, E. S.; LEUNDA, M. R.; ODEON. 2001. Experimental infection with bovine viral diarrhea virus (BVDV) genotype 2 in calves with neutralizing antibodies to BVDV genotype 1. *Arch. Med. Vet.*, 33: 185-192.

- ROSSI, C.R., BRIDGMAN, C.R.; KIESEL, G.K. 1980. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 1680-1681.
- RUMENAPF, T.; MEYERS, G.; STARK, R.; THIEL, H.J. 1991. Molecular characterization of hog cholera virus. *Arch. Virol. Suppl.*, 3: 7-18.
- SALIKI, J. T.; FULTON, R.W.; HULL, S.R.; DUBOVI, E. J. 1997. Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle serum. *J. Clin. Microb.*, 35: 803-807.
- SANDVIK, T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microb.*, 64: 123-134.
- SHAHRIAR, F.M.; CLARK, E.G.; JANZEN, E.; WEST, K.; WOBESER, G. 2002. Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Can. Vet. J.*, 43: 863- 868.
- SHI, T.; COTE, R.J.; TAYLOR, C.R. (2001). Antigen Retrieval Techniques: Current Perspectives. *J. Histochem. Cytochem.*, 49: 931-937.
- SHIN, T.; ACLAND, H. 2001 Tissue distribution of bovine viral diarrhea virus antigens in persistently infected cattle. *J. Vet. Sci.* 2: 81-84.
- SHOPE, R.E.; MUSCOPLAT, C.C.; CHEN, A.W.; JOHNSON, D.W. 1976. Mechanism of Protection from Primary Bovine Viral Diarrhea Virus Infection. I. The effects of Dexamthasone. *Can. J. Comp. Med.*, 40: 355-359.
- SPAGNUOLO, M; KENNEDY, S.; FOSTER, J.C.; MOFFETT, D.A.; ADAIR, B.M. 1997. Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection in Bone Marrow of Experimentally Infected Calves. *J. Comp. Path.*, 116: 97-100.
- SPAGNUOLO-WEAVER, M.; ALLAN, G.M.; KENNEDY, S.; FOSTER, J.C.; ADAIR, B.M. 1997. Distribution of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea

virus antigens in tissues of calves following acute experimental infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 9: 287-297.

SSENTONGO, Y.K.; JOHNSON, R.H.; SMITH, J.R.1980. Association of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus with ovaritis in cattle. *Aust. Vet. J.*, 56: 272-273.

STARK, R.; MEYERS, G.; RÜMENAPF, T.; JÜRGEN THIEL, H. 1993. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoproteasa and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.*, 67: 7088-7095.

STOFFREGEN, B.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; POHLENZ, J. 2000. Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. *Vet. Microb.*, 77: 157-162.

SWASDIPAN, S.; BIELEFELT- OHMANN, H.; PHILLIPS, N.; KIRKLAND, P.D.; MC. GOWAN, M.R. 2001. Rapid Transplacental Infection with Bovine Pestivirus Following Intranasal Inoculation of Ewes in Early Pregnancy. *Vet. Pathol.*, 38: 275-280.

TARABLA, H. D.; VOTERO, A. J.; LAGER, I.A.; SADIR, A. M. Y SCHUDEL, A. A. 1980. Diagnóstico serológico y características epizootiológicas de dos casos de diarrea vírica bovina. *Enfermedad de las mucosas. Gac. Vet.*, T XLII-354: 588-593.

THÜR, B.; HILBE, M.; STRASSER, M.; EHRENSPERGER, F. 1997. Immunohistochemical diagnosis of Pestivirus infections associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am.J. Vet. Res.*, 58: 1371-1375.

THÜR, B.; CAPLAZI, P.; HILBE, M.; ZLINSZKY, K.; STRASSER, M.; CORBOZ, L.; EHRENSPERGER, F. 1998. Pestivirus as causative agent of abortion and perinatal mortality in cattle and sheep in Switzerland. *Dtsch. Tierärztl Wochenschr.*, 105: 145-148.

- THÜR, B.; HOFMANN, M.A. 1998. Comparative detection of classical swine fever virus in striated muscle from experimentally infected pigs by reverse transcription polymerase chain reaction, cell culture isolation and immunohistochemistry. *J. Virol. Methods*, 74: 47-56.
- TREMBLAY, R. 1996. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Med.*, 91: 858-866.
- TSUBOI, T.; IMADA, T. 1998. Bovine Viral Diarrhoea Virus Replication in Bovine Follicular Epithelial Cells Derived from Persistently Infected Heifers. *J. Vet. Med. Sci.*, 60: 569-572.
- UNDERDAHL, N.R.; GRACE, O.D.; HOERLEIN, A.B. 1957. Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease. *Proc. Soc. Biol. Med.*, 94: 795.
- VADILLO, S.; PÍRIZ, S.; MATEOS, E. 2002. *Manual de Microbiología Veterinaria*. España, Editorial Interamericana. Mc Graw- Hill: 731-738. 853 págs.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; BRUSCHKE, C.J.; VAN RIJN, P.A. 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet. Microb.*, 64, 2-3: 169-183.
- VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E.; DE KRUIF, A. 1998. Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in zona-free and zona-intact in vitro produced bovine embryos and the effect on embryo quality. *Biol. Reprod.*, 58: 857-866.
- VANROOSE, G.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. 2000. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 131-143.

- VILCEK, S.; GREISER-WILKE, I.; NETTLETON, P.; PATON, D.J. 2000. Cellular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates. *Vet. Microb.*, 77: 129-136.
- VILCEK, S.; PATON, D.J.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEGA, S.; SCICIUNA, M.T.; PAIFI, V. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.*, 146: 99-115.
- WARD, A.C.S.; KAEBERLE, M.L. 1984. Use of an immunoperoxidase stain for the demonstration of bovine viral diarrhea virus by light and electron microscopies. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 165-170.
- WARRENER, P.; COLLETT, M.S. 1995. Pestivirus NS3 (p80) possesses RNA helicase activity. *J. Virol.*, 69: 1720-1726.
- WEILAND, E.; STARK, R.; HAAS, B.; RÜMENAPF, T.; MEYERS, G.; THIEL, H.J. 1990. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.*, 64: 3563- 3569.
- WEILAND, F.; WEILAND, E.; UNGER, G.; SAALMÜLLER, A.; THIEL, H-J. 1999. Localization of pestiviral envelope proteins E^{ns} and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J. Gen. Virol.*, 80: 1157-1165.
- WENGLER, G. 1991. Family Flaviviridae en: "Classification and nomenclature of viruses. International Committee on Taxonomy of Viruses". (Franki, R.I.B.; Fauquet, C.M.; Knudson, D.L. and Brown, F. , eds). 5° ed., pp. 223-233. Springer Verlag, Berlín.
- WERNER, M. (1999). Tissue fixation and antigen retrieval. *Rev. Esp. Patol.* 32: 355-356.

WILHELMSSEN, C.L.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; CHEVILLE, N.; KLUGE, J.P.1991. Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired muscosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.*, 52: 269-275.

WINDISCH, J.M.; SCHNEIDER, R.; STARK, R.; WEILAND, E.; MEYERS, G.; THIEL, H.J. 1996. Rnase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 70,1: 352-358.

WISKERCHEN, M.; BELZER, S.; COLLETT, M. S. 1991. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhoea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.*, 65,8: 4508-4514.

WISKERCHEN, M.; COLLETT, M. S. 1991. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virol.*, 184: 341-350.

WHITMORE, H.L.; ZEMJANIS, R.; OLSON, J. 1981. Effect of bovine viral diarrhoea virus on conception in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 178: 1065-1067.

XU, J.; MÉNDEZ, E.; CARON, M.R.; LIN, C.; MURCKO, M.A.; COLLETT, M.S.; RICE, C.M. 1997. Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.*, 71: 5312-5322.

XUE, W.; BLECHA, F.; MINOCHA, H.C. 1990. Antigenic Variations in Bovine Viral Diarrhoea Viruses Detected by Monoclonal Antibodies. *J. Clin. Microb.*, 28, 8: 1688-1693.

XUE, W.; MINOCHA, H.C. 1993. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.*, 74: 73-79.

YAPKIC, O.; YAVRU, S.; BULUT, O.; KALE, M.; ATA, A. 2006. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in pregnant cows and their foetuses. Bull Vet. Inst. Pulawy, 50: 315- 317.

YERUHAM, I.; MICHAEL, M.; PERL, S. 2001. An Unusual congenital Malformation in a Calf with Serological Evidence of Foetal Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection. Acta Vet. Scand., 42: 425-428.

YU, M.; GOULD, A.R.; MORRISSY, C.J.; WESTBURY, H.A. 1994. High level expression of the envelope glycoprotein (gp 53) of bovine viral diarrhoea virus (Singer) and its potencial use as diagnostic reagent. Vet. Res., 34: 178-186.

ZÁBAL, O.; KOBRAK, A.L.; LAGER, I.A.; SCHUDEL, A.A.; WEBER, E.L. 2000. Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhea virus. Rev. Arg. Microbiol., 32: 27-32.

ZIMMER, G. M.; VAN MAANEN, I.; DE GOEY, J.; BRINKHOF, J.; WENTINK, H. 2004. The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples. Vet. Microb., 100, 3-4: 145-149.

ZOTH, S.C.; TABOGA, O.; KÖNIG, G.; PEREDA, A.; PALMA, E.L.; PICCONE, M.E. 2001. Expression and characterization of two structural proteins of bovine viral diarrhea virus (BVDV). Rev. Arg. Microb., 33: 15-21.

VIII- ANEXOS

ANEXO 1

LESIONES MICROSCÓPICAS Y GRADOS DE LESIÓN EN FETOS 1 a 10										
Lesiones Microscópicas	Feto N°									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hígado										
Congestión y Edema	0	0	0	1	0	2	0	2	0	2
Infiltrados mononucleares inters	0	2	0	0	2	0	2	2	0	0
Tumef. de hepatocitos	0	2	0	1	2	2	2	3	0	0
Focos de necrosis	0	0	0	0	2	0	1	2	0	0
Autólisis	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0
Corazón										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	2	0	0	0	2	0	0	2	0	1
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0
Pulmón										
Congestión y edema	2	1	0	2	0	0	0	2	0	0
Infiltrados mononucleares inters	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0
Focos de necrosis	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Hiperplasia del tejido linfoide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0
Riñón										
Degeneración tubular	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0
Necrosis tubular	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Autólisis	0	3	3	3	3	0	0	2	3	3
Adrenal										
Hiperplasia cortical	NP	NP	NP	0	0	0	0	NP	0	0
Atrofia cortical				0	0	0	0		0	0
Autólisis				3	3	0	0		3	3
Nódulos linfáticos										
Depleción linfoidea	3	3	0	2	2	2	2	2	0	2
Necrosis linfoidea	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Linfoadenitis	2	0	0	0	2	0	3	0	0	0
Hiperplasia linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0
Válvula ileo-cecal										
Inflamación en la mucosa	3	NP	0	0	0	0	0	NP	0	NP
Depleción y necrosis linfoidea	2		0	0	2	0	0		0	
Degen hialina pared arteriolas	0		0	0	0	0	0		0	
Vasculitis	1		0	0	0	0	0		0	
Autólisis	0		3	3	1	2	3		3	
Bazo										
Depleción linfoidea	2	0	0	0	2	0	2	2	0	2
Necrosis linfoidea	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Esplenitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia pulpa blanca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	3	3	2	0	1	1	0	3	0
Timo										
Depleción linfoidea	1	2	0	2	2	0	2	0	0	NP
Necrosis linfoidea	1	0	0	0	2	0	0	0	0	
Infiltrados leucocitarios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Autólisis	0	0	3	0	0	0	0	0	3	
Otros										
						P			Plac	
0: lesión ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa; NP: no procesado										
Pla: placenta; P: piel										

LESIONES MICROSCÓPICAS Y GRADOS DE LESIÓN EN FETOS 11 a 20										
Lesiones Microscópicas	Feto N°									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Hígado										
Congestión y Edema	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
Tumef. de hepatocitos	2	2	2	2	2	0	1	1	0	0
Focos de necrosis	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Corazón										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	1	0	2	0	0	0	2	1	1	0
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pulmón										
Congestión y edema	1	2	0	0	0	0	2	0	1	2
Infiltrados mononucleares inters	0	3	0	1	0	2	0	3	0	0
Focos de necrosis	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia del tejido linfoide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Riñón										
Degeneración tubular	0	2	NP	0	2	0	0	0	0	0
Necrosis tubular	0	0		0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	1	0		0	2	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0		3	0	0	2	0	0	3
Adrenal										
Hiperplasia cortical	NP	0	NP	0	0	NP	NP	0	NP	0
Atrofia cortical		0		2	0			0		0
Autólisis		0		0	0			0		0
Nódulos linfáticos										
Depleción linfoidea	1	1	2	2	0	2	2	2	2	0
Necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfoadenitis	1	1	2	0	2	0	0	2	2	0
Hiperplasia linfoidea	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Válvula ileo-cecal										
Inflamación en la mucosa	1	NP	NP	3	3	0	0	3	2	0
Depleción y necrosis linfoidea	0			0	0	0	0	3	2	0
Degen hialina pared arteriolas	0			0	0	0	0	0	0	0
Vasculitis	0			1	0	0	0	2	0	0
Autólisis	0			0	0	3	2	0	0	0
Bazo										
Depleción linfoidea	0	0	NP	2	2	0	0	2	2	1
Necrosis linfoidea	0	0		0	0	0	0	0	0	0
Esplenitis	1	0		2	2	0	0	0	0	0
Hiperplasia pulpa blanca	0	1		0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0		0	0	0	3	0	0	0
Timo										
Depleción linfoidea	0	0	NP	2	0	0	2	0	2	0
Necrosis linfoidea	0	0		0	0	0	2	0	0	0
Infiltrados leucocitarios	1	0		0	2	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0		0	0	0	0	0	0	0
Otros										
			T		T-E	Pla	Pla/T	T		Pla
0: lesión ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa; NP: no procesado										
T: tiroides; E: encéfalo; Pla: placenta										

LESIONES MICROSCÓPICAS Y GRADOS DE LESIÓN EN FETOS 21 al 30										
Lesiones Microscópicas	Feto N°									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Hígado										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Tumef. de hepatocitos	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Focos de necrosis	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	2	0	0	2	3	0
Corazón										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Pulmón										
Congestión y edema	2	1	0	0	0	2	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Focos de necrosis	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Hiperplasia del tejido linfoide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Riñón										
Degeneración tubular	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1
Necrosis tubular	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	3	0	0	2	2	0	2	2	3	0
Adrenal										
Hiperplasia cortical	NP	0	NP	NP	0	0	NP	0	NP	0
Atrofia cortical		0			0	0		0		0
Autólisis		0			0	0		0		0
Nódulos linfáticos										
Depleción linfoidea	2	2	2	1	2	2	1	2	0	2
Necrosis linfoidea	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Linfoadenitis	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0
Hiperplasia linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Válvula ileo-cecal										
Inflamación en la mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Depleción y necrosis linfoidea	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1
Degen hialina pared arteriolas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vasculitis	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Autólisis	2	1	2	2	3	3	2	3	3	0
Bazo										
Depleción linfoidea	2	1	2	0	2	2	0	2	0	2
Necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esplenitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia pulpa blanca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Timo										
Depleción linfoidea	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2
Necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Infiltrados leucocitarios	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros										
		T	P	Pla		T				
0: lesión ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa; NP: no procesado										
T: tiroides, P: piel; Pla: placenta										

LESIONES MICROSCÓPICAS Y GRADOS DE LESIÓN EN FETOS 31 al 40										
Lesiones Microscópicas	Feto N°									
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Hígado										
Congestión y Edema	0	1	0	2	0	2	0	0	0	2
Infiltrados mononucleares inters	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0
Tumef. de hepatocitos	3	0	1	0	0	0	0	3	2	0
Focos de necrosis	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corazón										
Congestión y Edema	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	3	0	0	0	0	1	0	1
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pulmón										
Congestión y edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Infiltrados mononucleares inters	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Focos de necrosis	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Hiperplasia del tejido linfoide	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Riñón										
Degeneración tubular	2	2	0	0	0	2	0	2	0	0
Necrosis tubular	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0
Adrenal										
	NP	NP			NP		NP			
Hiperplasia cortical			0	0		2		2	0	0
Atrofia cortical			0	0		0		0	0	0
Autólisis			0	0		0		0	0	0
Nódulos linfáticos										
Depleción linfoidea	2	1	0	0	0	0	0	0	2	0
Necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfoadenitis	3	2	0	0	0	2	3	0	0	2
Hiperplasia linfoidea	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Válvula ileo-cecal										
Inflamación en la mucosa	0	2	0	0	0	3	2	2	0	2
Depleción y necrosis linfoidea	0	2	0	0	0	2	0	1	2	2
Degen hialina pared arteriolas	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Vasculitis	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Bazo										
Depleción linfoidea	2	2	2	0	0	2	0	1	0	1
Necrosis linfoidea	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Esplenitis	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Hiperplasia pulpa blanca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0
Timo										
Depleción linfoidea	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Necrosis linfoidea	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0
Infiltrados leucocitarios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros										
	Pla/P	P/T			E	E/T	E	E/T		
0: lesión ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa; NP: no procesado										
Pla: placenta; P: piel; T: tiroides; E: encéfalo										

LESIONES MICROSCÓPICAS Y GRADOS DE LESIÓN EN FETOS 41 al 50										
Lesiones Microscópicas	Feto N°									
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Hígado										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	2	0	0	0	0	2	0	0	0	1
Tumef. de hepatocitos	0	2	0	0	0	2	2	2	0	2
Focos de necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Autólisis	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Corazón										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Pulmón										
Congestión y edema	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2
Focos de necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia del tejido linfoide	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Riñón										
Degeneración tubular	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Necrosis tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	2	0	0	0	2	2	0	0	0	3
Adrenal										
		NP						NP	NP	NP
Hiperplasia cortical	1		0	2	0	0	0			
Atrofia cortical	0		0	0	0	0	0			
Autólisis	0		2	0	2	2	0			
Nódulos linfáticos										
								NP		NP
Depleción linfoidea	1	0	0	1	0	0	1		2	
Necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0		2	
Linfoadenitis	1	3	2	0	0	0	2		0	
Hiperplasia linfoidea	0	2	1	0	0	0	0		0	
Autólisis	0	0	0	0	2	0	0		0	
Válvula ileo-cecal										
								NP		NP
Inflamación en la mucosa	2	1	0	0	0	2	0		2	
Depleción y necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0		1	
Degen hialina pared arteriolas	0	0	0	0	0	0	0		0	
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0		0	
Autólisis	0	0	3	2	2	0	0		0	
Bazo										
Depleción linfoidea	0	0	0	2	0	2	2	2	0	0
Necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esplenitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia pulpa blanca	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0
Timo										
							NP	NP		
Depleción linfoidea	0	2	2	2	0	0			2	2
Necrosis linfoidea	0	0	2	0	0	0			0	2
Infiltrados leucocitarios	0	0	0	0	0	0			0	0
Autólisis	0	0	0	0	2	0			0	0
Otros										
		T/E		T			T		E	T
0: lesión ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa; NP: no procesado										
T: tiroides; E: encéfalo;										

ANEXO 2

LESIONES MICROSCÓPICAS Y GRADOS DE LESIÓN EN FETOS CON AISLAMIENTO VIRAL										
Lesiones Microscópicas	Feto N°									
	1	3	7	12	13	14	18	19	25	28
Hígado										
Congestión y Edema	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Tumef. de hepatocitos	0	0	2	2	2	2	1	0	0	0
Focos de necrosis	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0
Autólisis	0	3	0	0	0	0	0	0	2	2
Corazón										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	2	0	0	0	2	1	1	1	0	0
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Pulmón										
Congestión y edema	2	0	0	2	0	0	0	1	0	0
Infiltrados mononucleares inters	2	0	3	3	0	0	3	0	0	0
Focos de necrosis	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia del tejido linfoide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Riñón										
Degeneración tubular	2	0	2	2	NP	0	0	0	0	0
Necrosis tubular	2	0	0	0	NP	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	2	0	NP	0	0	0	0	0
Autólisis	0	3	0	0	NP	3	0	0	2	2
Adrenal										
Hiperplasia cortical	NP	NP	0	0	NP	0	0	NP	0	0
Atrofia cortical			0	0	NP	2	0	NP	0	0
Autólisis			0	0	NP	0	0	NP	0	0
Nódulos linfáticos										
Depleción linfoidea	3	0	2	1	2	2	2	2	2	2
Necrosis linfoidea	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Linfoadenitis	2	0	3	1	2	0	2	2	0	0
Hiperplasia linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Válvula ileo-cecal										
Inflamación en la mucosa	3	0	0	NP	NP	3	3	2	0	0
Depleción y necrosis linfoidea	2	0	0	NP	NP	0	3	2	0	0
Degen hialina pared arteriolas	0	0	0	NP	NP	0	0	0	0	0
Vasculitis	1	0	0	NP	NP	1	2	0	0	0
Autólisis	0	3	3	NP	NP	0	0	0	3	3
Bazo										
Depleción linfoidea	2	0	2	0	NP	2	2	2	2	2
Necrosis linfoidea	2	0	1	0	NP	0	0	0	0	0
Esplenitis	0	0	0	0	NP	2	0	0	0	0
Hiperplasia pulpa blanca	0	0	0	1	NP	0	0	0	0	0
Autólisis	0	3	1	0	NP	0	0	0	0	0
Timo										
Depleción linfoidea	1	0	2	0	NP	2	0	2	0	0
Necrosis linfoidea	1	0	0	0	NP	0	0	0	0	0
Infiltrados leucocitarios	0	0	0	0	NP	0	0	0	0	0
Autólisis	0	3	0	0	NP	0	0	0	0	0
Otros										
					T		T			
0: lesión ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa; NP: no procesado										
T: tiroides										

LESIONES MICROSCÓPICAS Y GRADOS DE LESIÓN EN FETOS CON AISLAMIENTO VIRAL										
Lesiones Microscópicas	Feto N°									
	30	38	39	40	41	42	43	44	49	50
Hígado										
Congestión y Edema	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	2	2	0	0	2	0	0	0	0	1
Tumef. de hepatocitos	0	3	2	0	0	2	0	0	0	2
Focos de necrosis	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corazón										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pulmón										
Congestión y edema	0	0	0	2	2	1	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	0	1	0	3	0	0	0	2
Focos de necrosis	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia del tejido linfoide	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Riñón										
Degeneración tubular	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0
Necrosis tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3
Adrenal										
Hiperplasia cortical	0	2	0	0	1	NP	0	2	NP	NP
Atrofia cortical	0	0	0	0	0		0	0		
Autólisis	0	0	0	0	0		2	0		
Nódulos linfáticos										
Depleción linfoidea	2	0	2	0	1	0	0	1	2	NP
Necrosis linfoidea	1	0	0	0	0	0	0	0	2	
Linfoadenitis	0	0	0	2	1	3	2	0	0	
Hiperplasia linfoidea	0	0	0	0	0	2	1	0	0	
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Válvula ileo-cecal										
Inflamación en la mucosa	2	2	0	2	2	1	0	0	2	NP
Depleción y necrosis linfoidea	1	1	2	2	0	0	0	0	1	
Degen hialina pared arteriolas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Autólisis	0	0	0	0	0	0	3	2	0	
Bazo										
Depleción linfoidea	2	1	0	1	0	0	0	2	0	0
Necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esplenitis	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia pulpa blanca	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Autólisis	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0
Timo										
Depleción linfoidea	2	1	0	0	0	2	2	2	2	2
Necrosis linfoidea	0	1	2	0	0	0	2	0	0	2
Infiltrados leucocitarios	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros										
		E/T				T/E		T	E	T
0: lesión ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa; NP: no procesado										
E: encéfalo; T: tiroides										

ANEXO 3:

LESIONES MICROSCOPICAS Y GRADOS DE LESIÓN EN FETOS SIN AISLAMIENTO VIRAL

Lesiones Microscópicas	Feto N°									
	2	4	5	6	8	9	10	11	15	16
Hígado										
Congestión y Edema	0	1	0	2	2	0	2	2	0	0
Infiltrados mononucleares inters	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0
Tumef. de hepatocitos	2	1	2	2	3	0	0	2	2	0
Focos de necrosis	0	0	2	0	2	0	0	1	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2
Corazón										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	2	0	2	0	1	1	0	0
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
Pulmón										
Congestión y edema	1	2	0	0	2	0	0	1	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Focos de necrosis	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Hiperplasia del tejido linfoide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
Riñón										
Degeneración tubular	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0
Necrosis tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
Autólisis	3	3	3	0	2	3	3	0	0	0
Adrenal										
Hiperplasia cortical	NP				NP			NP		NP
Atrofia cortical		0	0	0		0	0		0	
Autólisis		3	3	0		3	3		0	
Nódulos linfáticos										
Depleción linfoidea	3	2	2	2	2	0	2	1	0	2
Necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfoadenitis	0	0	2	0	0	0	0	1	2	0
Hiperplasia linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Autólisis	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
Válvula ileo-cecal										
Inflamación en la mucosa	NP	0	0	0	NP	0	NP	1	3	0
Depleción y necrosis linfoidea		0	2	0		0		0	0	0
Degen hialina pared arteriolas		0	0	0		0		0	0	0
Vasculitis		0	0	0		0		0	0	0
Autólisis		3	1	2		3		0	0	3
Bazo										
Depleción linfoidea	0	0	2	0	2	0	2	0	2	0
Necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esplenitis	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
Hiperplasia pulpa blanca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	3	2	0	1	0	3	0	0	0	0
Timo										
Depleción linfoidea	2	2	2	0	0	0	NP	0	0	0
Necrosis linfoidea	0	0	2	0	0	0		0	0	0
Infiltrados leucocitarios	0	0	0	0	0	0		1	2	0
Autólisis	0	0	0	0	0	3		0	0	0
Otros										
				P		Pla			T-E	Pla

0: lesión ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa; NP: no procesado

P: piel; Pla: placenta; T: tiroides; E: encéfalo

LESIONES MICROSCOPICAS Y GRADOS DE LESIÓN EN FETOS SIN AISLAMIENTO VIRAL										
Lesiones Microscópicas	Feto N°									
	17	20	21	22	23	24	26	27	29	31
Hígado										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Tumef. de hepatocitos	1	0	1	0	2	0	0	0	0	3
Focos de necrosis	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Corazón										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Infiltrados mononucleares inters	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Pulmón										
Congestión y edema	2	2	2	1	0	0	2	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3
Focos de necrosis	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0
Hiperplasia del tejido linfoide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Riñón										
Degeneración tubular	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
Necrosis tubular	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
Infiltrados mononucleares inters	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	2	3	3	0	0	2	0	2	3	0
Adrenal										
Hiperplasia cortical	NP		NP		NP	NP		NP	NP	NP
Atrofia cortical		0		0			0			
Autólisis		0		0			0			
Nódulos linfáticos										
Depleción linfoidea	2	0	2	2	2	1	2	1	0	2
Necrosis linfoidea	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Linfoadenitis	0	0	0	0	2	0	0	1	0	3
Hiperplasia linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Válvula ileo-cecal										
Inflamación en la mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Depleción y necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Degen hialina pared arteriolas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	2	0	2	1	2	2	3	2	3	0
Bazo										
Depleción linfoidea	0	1	2	1	2	0	2	0	0	2
Necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esplenitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia pulpa blanca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Timo										
Depleción linfoidea	2	0	2	0	0	2	2	0	0	0
Necrosis linfoidea	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Infiltrados leucocitarios	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros										
	T/Pla	Pla		T	P	Pla	T			Pla/P
0: lesión ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa; NP: no procesado										
T: tiroides; Pla: placenta; P: piel										

LESIONES MICROSCOPICAS Y GRADOS DE LESIÓN EN FETOS SIN AISLAMIENTO VIRAL										
Lesiones Microscópicas	Feto N°									
	32	33	34	35	36	37	45	46	47	48
Hígado										
Congestión y Edema	1	0	2	0	2	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0
Tumef. de hepatocitos	0	1	0	0	0	0	0	2	2	2
Focos de necrosis	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
Corazón										
Congestión y Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Pulmón										
Congestión y edema	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Infiltrados mononucleares inters	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Focos de necrosis	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Hiperplasia del tejido linfoide	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Riñón										
Degeneración tubular	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Necrosis tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrados mononucleares inters	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	2	0	0	2	2	2	0	0
Adrenal										
Hiperplasia cortical	NP			NP		NP				NP
Atrofia cortical		0	0		2		0	0	0	
Autólisis		0	0		0		2	2	0	
Nódulos linfáticos										
Depleción linfoidea	1	0	0	0	0	0	0	0	1	NP
Necrosis linfoidea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Linfoadenitis	2	0	0	0	2	3	0	0	2	
Hiperplasia linfoidea	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
Autólisis	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
Válvula ileo-cecal										
Inflamación en la mucosa	2	0	0	0	3	2	0	2	0	NP
Depleción y necrosis linfoidea	2	0	0	0	2	0	0	0	0	
Degen hialina pared arteriolas	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Vasculitis	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Autólisis	0	0	2	0	0	0	2	0	0	
Bazo										
Depleción linfoidea	2	2	0	0	2	0	0	2	2	2
Necrosis linfoidea	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esplenitis	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Hiperplasia pulpa blanca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autólisis	0	0	2	0	0	2	2	0	0	0
Timo										
Depleción linfoidea	0	0	1	0	0	0	0	0	NP	NP
Necrosis linfoidea	0	0	1	0	0	0	0	0		
Infiltrados leucocitarios	0	0	0	0	0	0	0	0		
Autólisis	0	0	0	0	0	0	2	0		
Otros										
	P/T			E	E/T	E			T	
0: lesión ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa; NP: no procesado										
P: piel; T: tiroides; E: encéfalo										