

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DETECCIÓN DEL VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA POR
INMUNOHISTOQUÍMICA Y ELISA DE CAPTURA DE ANTÍGENO EN
ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

EDNA VIANEY VALENCIA MORALES

**ASESORES: DRA. ELIZABETH MORALES SALINAS
MVZ EAPV FÉLIX D. SÁNCHEZ GODOY
MVZ MPA FRIDA SALMERÓN SOSA**

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, Dra. Elizabeth Morales Salinas, MVZ EAPV Félix Domingo Sánchez Godoy y MVZ MPA Frida Salmerón Sosa. Gracias por su confianza e infinita paciencia, por estar conmigo en todo momento y por contribuir en mi desarrollo profesional.

A los Doctores Alfonso López Mayagoitia y Javier Lértora por proporcionarme los testigos positivos para la realización de la técnica de Inmunohistoquímica y al Dr. Francisco Carvallo Chaigneau por ayudarme a conseguirlos.

Al doctor Jaime Campuzano Granados por proporcionarme el anticuerpo secundario.

A los Doctores Mario Santacruz A. y José Antonio Vázquez García, por darme los animales para este estudio y ayudarme en la toma de muestras.

Al Doctor Néstor Ledesma Martínez por las veces en que dejó su trabajo por acompañarnos hasta Tizayuca.

Al técnico Luis Antonio Morales Arreola por realizar los cortes histológicos de ésta tesis.

Al fotógrafo Jaime Eugenio Córdova por su colaboración con el material fotográfico.

A todos mis profesores por compartir conmigo sus conocimientos.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por mi formación.

“Si me das fortuna,
no me quites la razón.
Si me das éxito,
No me quites la humildad.
Si me das humildad,
no me quites la dignidad.
Enséñame a querer a la gente como a mi mismo.
A no juzgarme como los demás.
No me dejes caer en el orgullo si triunfo.
Ni en la desesperación si fracaso.”
Mahatma Gandhi

CONTENIDO

Página

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| • GENERALIDADES | 2 |
| • CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS..... | 3 |
| • INFECCIONES CON EL VDVB EN ANIMALES INMUNOCOMPETENTES NO PREÑADOS..... | 5 |
| • INFECCIONES CON EL VDVB EN ANIMALES INMUNOTOLERANTES..... | 6 |
| • INFECCIÓN PERSISTENTE | 6 |
| • ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS | 8 |
| • HISTOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS | 11 |
| • FUENTES DE INFECCIÓN Y MÉTODOS DE TRANSMISIÓN | 15 |
| • DIAGNÓSTICO DE DVB SEGÚN SU PRESENTACIÓN | 18 |
| • PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE VDVB | 20 |
| JUSTIFICACIÓN | 25 |
| OBJETIVO GENERAL | 25 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 25 |
| HIPÓTESIS | 25 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 26 |
| • GRUPO DE ANIMALES | 26 |
| • MUESTRAS PARA ELISA | 26 |
| • MUESTRAS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA | 26 |
| • PRUEBA DE ELISA | 26 |
| • MÉTODO DE INMUNOHISTOQUÍMICA | 27 |
| • ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 30 |
| RESULTADOS | 31 |
| DISCUSIÓN | 32 |
| CONCLUSIONES | 36 |
| REFERENCIAS | 37 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | <u>Página</u> |
|----------------------|---------------|
| FIGURAS | 43 |
| CUADROS | 45 |

RESUMEN

VALENCIA MORALES, EDNA VIANEY. Detección del Virus de Diarrea Viral Bovina por inmunohistoquímica y ELISA de captura de antígeno en animales persistentemente infectados (bajo la dirección de Dra. Elizabeth Morales Salinas, MVZ EAPV Félix D. Sánchez Godoy y MVZ MPA Frida Salmerón Sosa).

Se realizó un estudio con 80 becerras Holstein de hasta tres meses de edad, cuyo objetivo fue comparar el número de animales detectados como persistentemente infectados (PI) con el Virus de Diarrea Viral Bovina, mediante la prueba de ELISA de captura de antígeno con un punto de corte de 0.300 y el método de inmunohistoquímica (IHQ) Estreptoavidina-biotina-peroxidasa en biopsias de piel de oreja, utilizando un anticuerpo monoclonal (gp53/E2) desarrollado en ratón. Con la ELISA de captura de antígeno no fue posible identificar animales positivos al VDVB; sin embargo, se detectaron antígenos del VDVB en el 15% (12 casos) de las biopsias evaluadas por inmunohistoquímica. Los sitios en donde la inmunopositividad se encontró con mayor frecuencia fueron células mononucleares de la dermis, células epiteliales de la epidermis y folículos pilosos. Los resultados obtenidos se analizaron por la prueba de χ^2 de homogeneidad encontrándose diferencia significativa de que la capacidad para detectar animales PI mediante la técnica de ELISA de captura de antígeno y la IHQ es diferente. Se concluye que la IHQ es un método de diagnóstico eficaz, útil en la detección temprana de animales PI, siendo más sensible que la ELISA, por lo que su identificación permite la eliminación oportuna de dichos animales, reduciendo las pérdidas económicas, la diseminación del virus en el hato y el desarrollo de generaciones completas de animales PI.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un virus ARN y se encuentra clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* y el género *Pestivirus*. El VDVB tiene una distribución mundial y la infección en el ganado es común, lo cual queda de manifiesto por el gran número de animales seropositivos en la población bovina.^{1,2} La diarrea viral como se describió por primera vez en Nueva York en 1946 por Olafson y colaboradores, es una enfermedad aguda, altamente contagiosa que es raramente fatal y que se caracteriza por fiebre, diarrea, lesiones en las mucosas y leucopenia. La enfermedad y el agente fueron nombrados Diarrea Viral Bovina (DVB) y virus de la diarrea viral bovina (VDVB) respectivamente.^{2,3,4} El virus fue subsecuentemente asociado con una enfermedad entérica a la cual se denominó como enfermedad de las mucosas (EM), ésta era altamente fatal y ocurría esporádicamente, el cuadro clínico consistía en fiebre, descarga nasal mucosa, anorexia, diarrea constante o intermitente que frecuentemente contenía sangre, así como erosiones y úlceras en el tracto gastrointestinal, deshidratación rápida y muerte. La EM se describió en Estados Unidos como una enfermedad con alta morbilidad (2-50%), y casi siempre fatal.^{5,6,7} Los aislamientos iniciales del VDVB no producían efecto citopático en cultivo celular, mientras que un aislamiento de EM producía efecto citopático. Esta característica de efecto citopático o no citopático se conoce como el biotipo del virus. Actualmente se ha establecido que la enfermedad de las mucosas ocurre sólo cuando los bovinos han nacido inmunotolerantes y persistentemente infectados con un virus no citopático y sufren de una superinfección con un virus citopático.^{5,8}

La respuesta clínica a la infección depende de factores tales como estado inmunológico, si el animal es inmunocompetente o inmunotolerante, la preñez, la edad gestacional del feto y el estrés asociado a factores del medio ambiente. Asimismo se han descrito diferencias en la virulencia entre aislamientos no citopáticos de VDVB. Existen dos grupos de VDVB que se han reconocido con base a su genotipo y se han designado como VDVB 1a, 1b y VDVB 2. El grupo 1 de VDVB contiene virus que se usa para la producción de vacunas, pruebas de diagnóstico e investigación, mientras que el grupo 2 representa aislamientos a partir de sueros fetales, animales persistentemente infectados (PI) becerros nacidos de madres vacunadas contra el VDVB, y ganado que ha muerto por una forma aguda de infección denominada síndrome hemorrágico.^{3,5,8,9}

1.2 Clasificación y características del virus

El VDVB se confirmó como una nueva entidad viral distinta de la peste bovina y de otros virus exóticos. El VDVB junto con el virus de la fiebre porcina clásica y el virus de la enfermedad de la frontera en ovinos fueron clasificados dentro del género de los *Pestivirus* nombre dado por Horzinek⁴. Para esa época, los *Pestivirus* eran considerados como agentes diferentes a los *Togavirus*, los cuales no eran transmitidos por artrópodos. Posteriormente los *Pestivirus* se separaron de los *Togavirus* por la secuencia de nucleótidos de su ARN genómico, descrita por Meyers, Collett y colaboradores en 1988.⁴ A partir de entonces, la incertidumbre taxonómica que existía para la clasificación del VDVB y los *Pestivirus* de las ovejas y cerdos dentro de los *Togaviridae* o *Flaviviridae* quedó resuelta, siendo la clasificación definitiva *Pestivirus* como un género dentro de la familia *Flaviviridae*.^{2,4,6,7,10,11}

Los pestivirus bovino, ovino y porcino se encuentran cercanamente relacionados, infectan y se replican alternadamente en cualquiera de estas especies, aunque con eficiencia regular. Los viriones son morfológica y fisicoquímicamente similares. El genoma ARN es virtualmente del mismo tamaño y los polipéptidos estructurales y no estructurales son muy similares, por lo que se presenta actividad antigénica cruzada.^{4,7,10,11}

El VDVB se replica eficientemente sólo en células derivadas de artiodáctilos lo que refleja el rango de hospederos *in vivo* para este agente. La replicación óptima tiene lugar en células de bovino, ovino o caprino, mientras que la replicación en células de cerdo es menos eficiente. El virus se adapta con dificultad a la replicación en células de conejo y es la única especie de laboratorio que sirve como hospedero para el virus.^{4,7}

Cuando el VDVB se pone en contacto con una célula hospedera susceptible, se inician una serie de pasos que resultan en la producción de viriones, esto se denomina ciclo de replicación productiva y se realiza completamente en el citoplasma de la célula. El pico de liberación de viriones ocurre entre las 12 y 14 horas después de iniciada la infección, cada célula infectada libera de 100 a 1000 viriones.⁴

El genoma estándar del VDVB está constituido por 12,500 nucleótidos (los virus CP son una excepción). La composición de las bases es 32% A, 22% T, 26% G y 20% C.^{4,10,11}

Los viriones tienen una constitución compleja que consta de una envoltura y una nucleocápside, son esféricos a pleomórficos y miden 40–60 nm de diámetro. La nucleocápside es redonda y exhibe simetría poliédrica.¹⁰

El virión del VDVB consiste en una estructura central que contiene ARN y la proteína de cápside p14/C, rodeada por una membrana lipídica con dos glicoproteínas ancladas en ella gp25/E1 y gp53/E2. En los viriones se encuentra una tercera glicoproteína débilmente unida a la envoltura por interacciones no caracterizadas (gp48/E0). La función de las proteínas y lípidos que rodean la molécula de ARN es tomar el genoma viral en el citosol de células infectadas y colocarlo en el citosol de las células blanco no infectadas. Las proteínas estructurales se requieren para realizar dos trabajos aparentemente opuestos; estos son ensamblar viriones, envolver el ARN, liberación de viriones y adhesión. La estructura central está constituida por una molécula simple de ARN cubierta por la nucleocápside (proteína p14/C). Existen tres glicoproteínas que parecen estar asociadas con la envoltura del virión en diferentes estados de maduración: gp48/E2, gp25/E1 y gp53/E2. El VDVB no citopático (NCP) se encuentra presente en más del 90% de las infecciones en el ganado, debido a esto se considera a este biotipo como el VDVB estándar. El VDVB que se aísla de los casos de enfermedad de las mucosas ocasiona efectos citopáticos (CP) en cultivos celulares y se denomina como VDVB-CP. Este tipo de virus cuenta con variaciones genómicas.^{4,10-13}

1.3 INFECCIONES CON EL VDVB EN ANIMALES INMUNOCOMPETENTES NO PREÑADOS

En el pasado, se había dado poca importancia a las infecciones con el VDVB como causantes de enfermedad clínica en el ganado. La infección con el VDVB

se ha enfocado principalmente en las consecuencias de la infección transplacentaria, particularmente en aquella que resulta en el nacimiento de becerros inmunotolerantes y persistentemente infectados (PI) y el papel que estos animales desempeñan en la patogenia de la enfermedad de las mucosas. Para la mayoría, el VDVB ha sido considerado como un causante únicamente de enfermedad subclínica y de pocos signos clínicos en los animales inmunocompetentes. Cuando la infección resulta en un cuadro clínico moderado se le denomina Diarrea Viral Bovina. En años recientes (1995) se ha reconocido otra forma de infección aguda en bovinos inmunocompetentes y se conoce como síndrome hemorrágico.^{1,3,14-16}

Los hallazgos presentes en infecciones por el VDVB en animales inmunocompetentes no preñados y preñados, así como los defectos congénitos más comunes presentes en los becerros se resumen en los cuadros 1,2 y 3 respectivamente.¹⁵

1.4 INFECCIONES CON EL VDVB EN ANIMALES INMUNOTOLERANTES

1.4.1 INFECCIÓN PERSISTENTE

La infección con el VDVB NCP en etapas tempranas del desarrollo fetal, antes de que se complete la maduración del sistema inmune fetal (150 a 200 días de gestación) puede traer como consecuencia animales inmunotolerantes al virus. La inmunotolerancia e infección persistente con el VDVB ocurre únicamente cuando el animal se infecta con un virus no citopático antes del día 125 de gestación. Los animales persistentemente infectados eliminan continuamente grandes cantidades de virus aún cuando estén clínicamente sanos, estos animales son inmunocompetentes con respecto a otros agentes.^{1-3,14-16} La

inmunotolerancia es específica a la cadena del virus no citopático infectante por lo que los animales PI son capaces de desarrollar una respuesta inmune a cadenas heterólogas del VDVB y pueden ser seropositivos. Los becerros PI que ingieren calostro pueden presentar anticuerpos contra el VDVB que llegan a interferir con la habilidad para aislar al virus. Los anticuerpos contra VDVB en animales PI disminuyen más rápidamente en comparación con los animales inmunocompetentes. La prevalencia de la infección persistente en los hatos bovinos es baja. Se ha estimado que uno de cada 100 a 1000 becerros es PI. Los becerros PI son la fuente de infección más importante para la diseminación del virus. Si las hembras alcanzan la edad reproductiva, su descendencia será de animales PI, por lo que se pueden generar familias completas persistentemente infectadas. Estos animales tienen una tasa de mortalidad del 50% durante el primer año de vida. Los becerros pueden tener un menor tamaño al nacimiento y una pobre tasa de crecimiento por lo que son eliminados del hato. La presencia de este tipo de animales sugiere un problema de infección persistente. No todos los becerros PI se encuentran tan afectados por lo que alcanzan la edad reproductiva y llegan a rastro.^{1-3,14-25}

Los animales PI se encuentran en riesgo de presentar enfermedad de las mucosas (EM) si sufren una superinfección con un virus citopático.

Bielefeldt¹⁶ realizó estudios en animales PI clínicamente sanos que habían sido infectados de manera natural o experimental para describir las lesiones histológicas encontradas. Los hallazgos histomorfológicos consistían en glomerulonefritis intersticial no supurativa, hepatitis periportal no supurativa, hiperplasia del tejido linfoide peribronquial y bronquiolar, necrosis multifocal en

el epitelio de la lengua y esófago, acompañada por infiltrado por mononucleares en la submucosa.¹⁵⁻²⁷

En animales con retraso del crecimiento evidente, se observaron lesiones macro y microscópicas. Los belfos, nariz y espacios interdigitales presentaban úlceras y erosiones. Microscópicamente los cambios se caracterizaron por infiltrado subepitelial ligero por mononucleares hasta hiperqueratosis paraqueratósica marcada. Cambios similares se pueden apreciar en el epitelio queratinizado del esófago, rumen, retículo y omaso. A pesar de la ausencia de manifestaciones clínico-patológicas, el antígeno viral se distribuye a una gran cantidad de tejidos. La localización del antígeno del VDVB en los diferentes tejidos se resume en el cuadro 4.¹⁵⁻³⁰

1.4.2 ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS (EM)

La enfermedad de las mucosas ocurre cuando animales que son inmunotolerantes y PI con una cadena no citopática de VDVB sufren una superinfección con un virus citopático que presenta una gran homología con el virus persistente infectante. Debido a esto no cualquier combinación de virus citopático y no citopático da como resultado enfermedad de las mucosas. El origen del virus citopático puede ser externo, sin embargo, con mayor frecuencia la cadena no citopática se vuelve citopática mediante rearreglo molecular.^{7,13-15}

La EM existe en más de una forma clínica, se describe una forma aguda con mortalidad del 100% y una forma crónica que también se asocia con gran número de casos fatales después de un curso prolongado. Las diferencias en la relación entre el virus citopático y no citopático pueden ser responsables de la variación en la respuesta clínica. Por otra parte se puede presentar una

enfermedad subclínica y ocurrir la seroconversión cuando el virus superinfectante es heterólogo. En medio de estos dos extremos, con base en la relación existente entre ambos virus se pueden reconocer entidades como EM crónica y posiblemente una EM a partir de la cual la recuperación es posible.^{1,3,9,13-15,27}

1.4.2.1 Enfermedad de las mucosas aguda

La enfermedad de las mucosas es una forma esporádica de infección por VDVB y generalmente involucra animales entre los 6 meses y 2 años de edad. Usualmente menos del 5% del hato se encuentra afectado, pero la mortalidad es del 100%. Cuando un brote de enfermedad de las mucosas ocurre en un hato, frecuentemente los animales afectados se encuentran agrupados por edades y son todos becerros PI con la misma cadena de virus no citopático. Es posible por lo tanto, que cuando un virus citopático aparece en un becerro PI este lo disemine a otros becerros PI y subsecuentemente se produzca la EM. Los signos clínicos descritos para este tipo de presentación incluyen fiebre (40.5 a 41°C), depresión, debilidad, anorexia, taquicardia y taquipnea. A medida que la enfermedad progresa se presenta emaciación y deshidratación con acidosis. En hatos lecheros, la producción láctea disminuye. El curso de esta enfermedad oscila entre 2 a 3 días hasta 2 a 3 semanas ocasionando la muerte del animal.^{14,15,27}

Al examinar la cavidad oral se aprecian úlceras y erosiones en la gingiva, lengua, paladar blando y duro y comisuras labiales. Las lesiones pueden coalescer y formar grandes áreas de necrosis de la mucosa y úlceras en cavidad oral, cavidad nasal y narinas. Las lesiones erosivas se pueden desarrollar en las narinas o en la cavidad nasal y se han observado lesiones

similares en la vulva y pezones. Las lesiones orales acompañadas de ptialismo se encuentran en un 75 a 80% de los casos. La descarga nasal mucopurulenta está acompañada de lagrimeo excesivo y edema de la córnea. La diarrea profusa se presenta generalmente 2 a 3 días después de iniciados los signos clínicos. En casos hiperagudos, la muerte ocurre antes de que se presente la diarrea. Las heces son fétidas y pueden contener cantidades variables de sangre fresca o coágulos y cilindros intestinales de fibrina. Se puede presentar dificultad para defecar, los movimientos ruminales disminuyen y se llega a observar timpanismo.^{14,15,27}

La leucopenia severa ocurre desde las etapas tempranas de la enfermedad, también se puede observar neutropenia, linfopenia y trombocitopenia. Las infecciones bacterianas secundarias son comunes.^{1-3,14,15,27}

1.4.2.2 Enfermedad de las mucosas crónica

Un cierto porcentaje de bovinos que desarrolla enfermedad de las mucosas no muere en el tiempo esperado y presenta un cuadro crónico. A este cuadro se le ha dado el nombre diarrea viral bovina crónica, pero EM crónica es un nombre más descriptivo y adecuado con respecto a la patogenia. Al igual que en la EM aguda, se han demostrado ambos biotipos. La enfermedad crónica se caracteriza por inapetencia, pérdida de peso y emaciación progresiva. La diarrea puede ser progresiva o intermitente y se observa distensión abdominal. Las descargas nasal y ocular se observan frecuentemente, así como áreas de alopecia e hiperqueratinización en el área del cuello. Las lesiones erosivas se encuentran en boca, región perianal, prepucio, vulva, alrededor de las pezuñas, espacios interdigitales y talones. La falta de cicatrización de las heridas es un hallazgo importante en los casos crónicos de EM. Se puede desarrollar cojera

debido a laminitis, necrosis interdigital y deformidad de las pezuñas, las infecciones bacterianas secundarias son comunes. En el laboratorio clínico se observa pancitopenia, caracterizada por anemia, leucopenia, neutropenia y linfopenia. El ganado con enfermedad de las mucosas crónica llega a sobrevivir hasta 18 meses y finalmente muere por debilidad severa.^{14,15,27}

1.4.2.3 Enfermedad de las mucosas con recuperación

Existen estudios recientes de becerros persistentemente infectados que mostraron signología transitoria de EM después de la cual se recuperaron y permanecieron sanos hasta su sacrificio. Estos estudios son interesantes y se requiere de mayor investigación y realización de ensayos experimentales para definir esta forma de EM.

El tratamiento de cualquier forma de EM no ofrece ninguna garantía; aún cuando la recuperación es posible, estos animales permanecerán PI de por vida y pueden ser identificados y eliminados del hato. Aún cuando hay informes de fármacos inmunomoduladores usados en el tratamiento, es poco probable que estos fármacos puedan tener algún efecto a largo plazo y los animales permanecerán PI. El diagnóstico de enfermedad de las mucosas debe ser confirmado y los animales afectados deben ser removidos lo más pronto posible del hato.^{14,15}

1.5 HISTOPATOLOGÍA DE LA EM

A pesar de las variaciones en la apariencia patológica macroscópica, la imagen histológica en cada órgano o sistema es uniforme, con algunas variaciones atribuibles a la intensidad y progresión de las lesiones y tal vez modificadas por alteraciones secundarias.

Epitelio queratinizado. Los cambios iniciales en el epitelio queratinizado (piel, hocico, tracto alimentario alto, rumen, retículo y omaso) consisten en inflamación perivascular no supurativa. Se presenta engrosamiento de la epidermis, a lo largo del epitelio basal, lo que presenta un aspecto que semeja papilas. El tejido puede estar hiperémico, con hemorragias por diapédesis. La degeneración del epitelio y necrosis eosinofílica de algunas células en el estrato espinoso parece constituir el cambio inicial, el cual progresa a una necrosis celular diseminada con separación de las uniones intercelulares. Al mismo tiempo, se presenta exocitosis, sin relación aparente con las células necróticas, pero tal vez dirigida hacia células inaparentemente modificadas por la infección viral. A medida que esto progresa, los focos bien delimitados con apariencia reticular surgen en el estrato espinoso y pueden permanecer cubiertas por un estrato córneo intacto. De cualquier manera, eventualmente esta capa también pierde su integridad y se forman erosiones y úlceras. La capa basal permanece intacta mientras que los cambios antes mencionados progresan, pero pueden ocurrir cambios metaplásicos. Las células basales se vuelven escamosas pero si no hay ulceración y no se presentan infecciones bacterianas secundarias, la capa permanecerá intacta. En otras áreas, principalmente en la piel del cuello y hombros, los cambios pueden ser predominantemente paraqueratósicos, con la formación de “masas queratinoides” de 50 a 100 capas de células de grosor, entremezcladas con cantidades variables de detritus celulares, queratina e infiltrado por mononucleares. Los folículos pilosos y glándulas sudoríparas parecen estar involucrados solo relativamente en procesos tardíos, con infiltrado periglandular y perifolicular por mononucleares y posteriormente cambios degenerativos y

necróticos de los folículos. Se supone que en esta etapa se desarrolla la hipotricosis y alopecia.^{13-15,26,27,30}

Intestino y abomaso. Los cambios patológicos en el abomaso e intestino son principalmente atrofia y fusión de vellosidades, así como necrosis del epitelio de las criptas. Los detritus celulares y moco se acumulan en la luz de la cripta ocluyéndola y dilatándola ocasionando aplanamiento del epitelio y pérdida de las microvellosidades. Especialmente sobre las placas de Peyer, estos cambios progresan a un estado de atrofia completa de criptas y vellosidades, dejando un epitelio plano cubriendo la lámina propia fibrótica casi con tejido acelular. Aún cuando esas áreas parecen propensas a ulcerarse, no significa que la necrosis descrita macroscópicamente en la mayoría de los casos corresponda a áreas con metaplasia o atrofia epitelial completa. En algunos casos o en algunas áreas del intestino, la metaplasia de las células caliciformes puede ser el principal cambio de las criptas y es acompañada por excesiva producción y acumulación de moco. La lesión principal de la lámina propia consiste en infiltrado masivo por mononucleares, principalmente macrófagos. Otros cambios incluyen edema en las capas subepiteliales, hiperemia y diapedesis.^{13,15,26,27}

Órganos linfoides. En tejido linfoide (timo, bazo, linfonodos y placas de Peyer) de animales PI clínicamente sanos no ocurren cambios morfológicos significativos, o son muy ligeros a pesar de la amplia distribución del virus en las células. Los cambios que pueden ocurrir son atrofia del timo y reactividad de los linfonodos y esto en becerros débiles con retraso en el crecimiento, como consecuencia de infecciones transitorias y estrés más que como un antecedente de infecciones secundarias.

En casos agudos de corta duración (1-4 días), la estructura general del timo se mantiene, pero la corteza se aprecia reducida, debido a la presencia de cuerpos apoptóticos o timocitos necróticos, se observan células epiteliales prominentes y macrófagos activados. Por microscopía electrónica se ha determinado que los cambios degenerativos son aparentemente en las células epiteliales, en particular en la zona cortical.

En casos subagudos a crónicos de EM, el timo se caracteriza por una pérdida progresiva de la organización, la corteza puede permanecer como una delgada capa de epitelio colapsado, rodeada por tejido fibro-reticular con corpúsculos de Hassall prominentes. Algunos linfocitos permanecen de manera aislada y hay infiltración grasa abundante, sobretodo en animales viejos.

Las placas de Peyer también presentan atrofia linfoide severa durante las fases hiperaguda, aguda y en casos crónicos. Los cambios observados en linfonodos regionales y mesentéricos varían considerablemente entre animales y comprenden atrofia linfoide de la zona subsinusoidal periférica y cambios atróficos en folículos primarios y secundarios.

La médula se encuentra ligera o moderadamente expandida, debido al resultado de la reacción de los sinusoides, la cual se caracteriza por acumulación de linfocitos, monocitos y macrófagos activados.

Los cambios observados en los linfonodos peribronquiales y retrofaríngeos generalmente se asocian con reacciones a infecciones respiratorias bacterianas secundarias.

En el bazo se presenta atrofia linfoide periarteriolar y cambios similares a los descritos en linfonodo aunque generalmente menos graves.^{13,15,26,27,30}

1.6 FUENTES DE INFECCIÓN Y MÉTODOS DE TRANSMISIÓN

Fuentes de infección

Los animales PI se consideran como la fuente de infección más importante de VDVB, la cantidad de virus en estos animales es extremadamente alta. En muestras de suero diluidas hasta 10^{-6} se siguen detectando partículas virales al realizar el aislamiento. Los animales PI eliminan grandes cantidades de virus continuamente en descargas nasales, saliva, semen, orina, heces, lágrimas y leche. En semen de toros PI se ha detectado virus en diluciones de hasta 10^{-7} . El ganado con infección aguda también constituye una fuente de infección. En una infección aguda, el virus se excreta generalmente a partir del día 4 y hasta el día 10, pero puede ser excretado por un periodo más largo de tiempo. Los animales con infección aguda también eliminan virus en la mayoría de sus secreciones y excreciones, sin embargo, la cantidad de virus es mucho menor comparada con la secretada por los PI.

Además del ganado, el VDVB ha sido aislado a partir de muchos otros rumiantes incluyendo borregos y cabras, así como en cerdos, por lo tanto se consideran también una fuente potencial de infección.^{1,2,6,13,15,16}

1.7 Métodos de transmisión

Los métodos de transmisión pueden ser clasificados en verticales y horizontales. La transmisión vertical es de una generación a la siguiente. Por lo tanto, se puede decir que todos los animales PI son producidos por transmisión vertical; pero, en la mayoría de los casos la transmisión vertical es precedida por transmisión horizontal a la hembra, durante la infección aguda siguiente, el virus cruza la placenta e infecta al feto.^{6,16}

1.7.1 Transmisión vertical. El VDVB se excreta en el semen de toros con infección aguda y PI. Las hembras seronegativas inseminadas con semen infectado, se infectan pero raramente producen un feto PI. Se realizó un experimento inseminando 12 hembras seronegativas con semen de toros PI, todas quedaron preñadas y concibieron animales vivos, de los cuales solo uno fue PI; sin embargo no queda claro si la transmisión fue vertical a partir del toro o si inicialmente se dio una transmisión horizontal a la hembra y después la transmisión de nuevo al embrión.

A pesar de la alta mortalidad en los animales PI, muchos alcanzan la edad adulta y se reproducen. Se ha demostrado que todos los becerros nacidos de hembras PI serán PI; de esta manera pueden existir líneas familiares PI por muchas generaciones. La transmisión vertical también puede ocurrir después de la transferencia de embriones si el recipiente está contaminado. Si la hembra donante es PI, el VDVB se encuentra en niveles altos en el ambiente uterino y será transmitido con el embrión si no se siguen los procedimientos de lavado adecuados.^{6,16}

1.7.2 Transmisión horizontal. La transmisión horizontal puede ser directa o indirecta. El contacto directo entre animales susceptibles y animales PI es un medio de transmisión importante entre animales, presumiblemente más eficiente por contacto nasal. La transmisión aérea en distancias cortas es posible, aunque no ha sido comprobada experimentalmente. En hatos con bovinos PI en los cuales los animales fueron colocados en un mismo edificio o en edificios separados solamente por puertas, se ha observado una diseminación rápida de la infección. Cuando los animales susceptibles son separados a mayor distancia de los PI, la diseminación de la infección es muy

baja o ausente. La transmisión a partir de animales con infección aguda también ocurre, pero con mucha menor eficiencia a diferencia de los PI. Algunos estudios experimentales muestran que los animales susceptibles no se infectan a partir de animales con infección aguda aún cuando están en contacto cercano. Sin embargo, la seroconversión entre animales que se encuentran juntos sin la presencia de PI indica que la transmisión a partir de animales que presentan la infección aguda puede ocurrir.^{6,16}

A diferencia de la transmisión directa, la indirecta involucra un vehículo intermediario que transmite el patógeno entre animales infectados y susceptibles. Las posibilidades de transmisión indirecta dependen de la estabilidad del virus fuera del hospedero. En el laboratorio se ha visto que el VDVB permanece estable a temperaturas menores a 10°C y en un rango de pH de 3 a 9. El tiempo requerido para la inactivación del virus en células de bovino fue de 3 horas a 35°C, 3 días a 20°C y 3 semanas a 5°C.^{6,16}

La vacunación de hembras seronegativas preñadas, con virus activo de DVB puede resultar en infección transplacentaria del feto con las mismas consecuencias que la infección natural, incluyendo animales PI; además, las vacunas con virus activo tienen la capacidad de inducir enfermedad de las mucosas cuando se utilizan en animales PI porque algunas contienen el virus citopático de DVB. También se ha informado de la diseminación de la infección a partir de vacunas contaminadas con el VDVB. Comercialmente, el suero fetal preparado ha sido una fuente común de infección con el VDVB. Estos informes han promovido el mejoramiento de las medidas de seguridad, por lo que la transmisión por esta vía es menos frecuente.^{6,16,31}

Los ensayos realizados con la transmisión experimental del VDVB mediante moscas “chupadoras” de sangre, demostró que es posible aislar el virus a partir de esas moscas hasta 96 horas después de que fueron colectadas en un animal PI. Además, se ha demostrado que la transmisión entre un animal PI y uno susceptible era posible cuando 50 moscas se alimentaban de un animal PI por cinco minutos y 15 minutos después se alimentaban en un animal susceptible. También existen evidencias experimentales de que el VDVB puede transmitirse de manera indirecta a los bovinos como consecuencia del uso de instrumentos y equipo, se observó que el reutilizar jeringas y narigueros en animales susceptibles tres minutos después de que habían sido usadas en PI podía transmitir la infección.¹⁶

Con excepción del contacto directo con animales PI, la importancia práctica de los demás métodos de transmisión mencionados es difícil de evaluar.

1.8 DIAGNÓSTICO DE DVB SEGÚN SU PRESENTACIÓN

Debido a la compleja patogenia de las infecciones con el VDVB el diagnóstico de laboratorio es importante componente en la habilidad para controlar y prevenir las infecciones. La patogenia de los diferentes síndromes de la enfermedad determina el tiempo para la colección de las muestras e influencia la habilidad para establecer un diagnóstico adecuado de la enfermedad.

Al igual que en la mayoría de las infecciones virales, los métodos tradicionales como el aislamiento viral y la serología continúan siendo los métodos estándar para el diagnóstico. Recientemente, con el desarrollo de las técnicas moleculares, se han diseñado muchos ensayos para la detección de infecciones por VDVB.^{7,31}

1.8.1 Fundamentos para el muestreo

Para usar el mejor método de diagnóstico, es importante para el clínico y el laboratorio de diagnóstico tener una comprensión clara y sincronizada del motivo por el que se tomó la muestra. Esta consideración es importante porque no todos los métodos de diagnóstico disponibles para VDVB se pueden aplicar en todas las situaciones. A continuación se citan las razones más comunes para solicitar un análisis de identificación de VDVB.³¹

1.9 Pruebas para la eficacia de la vacuna. Está bien establecido que la presencia de anticuerpos neutralizantes en la sangre, se correlaciona con la protección adquirida por la vacunación; por esto, los títulos de anticuerpos en suero son un indicador útil de la eficacia de la vacunación.³¹

1.10 Control de calidad de los productos biológicos. El VDVB es un contaminante que puede estar presente en los productos biológicos derivados del ganado. En particular, el suero fetal bovino (uno de los principales componentes de los medios de cultivo celulares) frecuentemente contiene VDVB activo. La frecuencia de ocurrencia del virus en suero fetal bovino comercial no está necesariamente relacionada con la frecuencia de fetos o becerros virémicos. La mezcla de muestras de muchos animales significa que un lote de docenas de animales puede estar contaminado por un solo animal virémico. La presencia de anticuerpos contra VDVB en el suero fetal bovino puede interferir con las pruebas de aislamiento viral o seroneutralización. Las pruebas para los lotes de suero fetal bovino comercial deben comprender la detección del virus y de anticuerpos virales.³¹

1.11 Genotipificación. Existen algunas evidencias de que los genotipos del VDVB (1a, 1b y 2) pueden inducir varios tipos de síndromes clínicos, debido

a esto, existe la necesidad de establecer el genotipo obtenido del aislamiento del virus en cualquier situación. Además, la genotipificación se debe requerir por razones epidemiológicas, por ejemplo, si ocurre un brote de DVB en animales vacunados, sería útil determinar si el genotipo causante de la enfermedad es diferente del genotipo de la vacuna.³¹

1.12 PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE VDVB

1.12.1 Aislamiento viral.

A pesar de los recientes avances en el diagnóstico de VDVB, la identificación y cultivo del virus a partir de especímenes clínicos continúa siendo la “prueba de oro” para el diagnóstico. El virus se replica fácilmente en muchas líneas celulares de varias especies animales. Sin embargo, sólo tres líneas celulares son las más ampliamente utilizadas en los laboratorios de diagnóstico para el aislamiento del virus: cornetes nasales (Bovine turbinate -BT-), testículo (Btest) y riñón (Madin Darby Bovine Kidney -MDBK-). Existen evidencias de que BT y Btest son más sensibles al VDVB que MDBK y otras líneas celulares continuas. Además de la sensibilidad de estos cultivos celulares, otro factor que interviene en la habilidad para cultivar el VDVB es el método de inoculación.³¹⁻³⁴

En el animal vivo, la mejor muestra para el aislamiento del virus es la sangre completa, de la cual, la capa de células blancas se extrae y se utiliza como el inóculo. Las mejores muestras que se pueden tomar a la necropsia en un feto abortado son órganos linfoides como bazo, placas de Peyer, linfonodos mesentéricos y timo. Otras muestras remitidas frecuentemente como suero, hisopos nasales, heces, semen y otros tejidos, pueden no ser óptimos para el aislamiento en infecciones agudas, porque es posible que exista interferencia con los anticuerpos neutralizantes. En animales PI, la cantidad de virus

presente en el organismo es tan elevada que cualquier secreción, excreción o tejido es satisfactoria para el aislamiento viral. Un periodo de 4 a 5 días es suficiente para el aislamiento. Sin embargo, uno de cada 25 aislamientos positivos requiere de un segundo pase. La replicación del virus en las células puede o no causar efectos citopáticos visibles; de esta forma, el VDVB se clasifica en dos biotipos, citopático (CP) y no citopático (NCP). Es importante notar que las cadenas NCP del virus son completamente patógenas y causan el rango completo de manifestaciones clínicas asociadas con el VDVB, con excepción de la enfermedad de las mucosas, la cual requiere la presencia de un par CP y NCP.

En el laboratorio, la mayoría de los aislamientos de VDVB (70-90%) son no citopáticos.

Para manipular un mayor número de muestras, por ejemplo en un análisis completo del hato en busca de animales PI, se deben utilizar métodos como el ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa, usando suero como muestra. Esencialmente, el suero se inocula en células BT y Btest para la replicación del virus en 96 pozos. Después de un periodo de cuatro días, los pozos se fijan con acetona al 20%, se secan y la presencia del virus se determina por ELISA o tinción de inmunoperoxidasa.^{1,2,7,9,11,12,29,31-34}

1.12.2 Detección del antígeno

La detección del antígeno directamente, a partir de las muestras remitidas para el diagnóstico, es mucho más rápida y barata que el aislamiento viral. Sin embargo, la mayoría de los métodos para la detección directa del antígeno carece de sensibilidad en comparación al método de aislamiento viral y pueden no servir como una prueba final de inclusión o exclusión. Para el diagnóstico de

infecciones agudas, los métodos de detección de antígeno deben ser utilizados principalmente como un método de tamiz. Los métodos disponibles se agrupan en dos categorías: ELISA de captura de antígeno y tinción inmunológica de secciones de tejido frescas o fijadas en formalina e incluidas en parafina.

Se han descrito muchas “ELISA’s” de captura de antígeno y al menos dos están actualmente disponibles como reactivos de diagnóstico comercial. Estas pruebas son útiles primeramente para buscar animales PI y no son confiables para el diagnóstico de infecciones agudas.

La detección de antígeno en secciones de tejido congelado por medio de anticuerpos fluorescentes es un método utilizado comúnmente por laboratorios de diagnóstico. Sin embargo, los resultados negativos no descartan la presencia del virus, debido a la falta de sensibilidad de la prueba.

En años recientes, la detección del antígeno del VDVB en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina mediante inmunohistoquímica (IHQ), se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico de infecciones agudas así como de infecciones persistentes. Últimamente, la IHQ en biopsias de piel (“muestras de oreja”) ha ganado una amplia aplicación en la búsqueda de ganado PI.^{7,11,12,17,21,23,31,34-36}

1.12.3 Inmunohistoquímica para la detección de animales PI

El primer informe de biopsias de piel utilizadas como método de detección de animales PI fue en 1996.^{23,31} En ese estudio se utilizaron 184 animales de los cuales 37 fueron positivos por IHQ. De estos animales, a 15 se les realizó ELISA de captura de antígeno (Ag-ELISA) y a 9 aislamiento viral (AV). En los 9 casos fue posible aislar el virus, mientras que de los otros 15, sólo 13 fueron positivos por Ag-ELISA; sin embargo, en los dos animales negativos por Ag-

ELISA fue posible aislar el virus. El resto de los animales del hato fueron negativos por ambos métodos IHQ y AV. Estos resultados sugieren un 100% de sensibilidad de la IHQ. En otro estudio se menciona un 97.5% de concordancia entre la IHQ en biopsias de piel y el AV. Para dicho estudio, se utilizaron 87 becerros, 41 de 42 animales fueron positivos por ambos métodos. Los 45 animales restantes fueron negativos a las dos pruebas. La discordancia en un animal pudo estar asociada a una mala identificación de la muestra, falla del anticuerpo primario para reconocer al virus o ausencia del virus en la sección de piel examinada.²¹

Se ha observado que la distribución del antígeno viral en la piel es generalizada, en un estudio realizado por Thur³⁷ y colaboradores se tomaron muestras de diferentes regiones de la piel a 18 animales positivos, los resultados fueron similares independientemente de la región de la piel utilizada (pabellón auricular, cuello, pecho, banda coronaria, y cola).

El uso de la IHQ para detectar becerros neonatos PI constituye un método adecuado para detectar animales PI con el VDVB.

Se han realizado estudios en animales vacunados con vacuna activa modificada, a los que posteriormente se toma varias biopsias de piel, en las cuales no se ha demostrado la presencia del virus, por lo que no es posible que se presenten falsos positivos. Otras ventajas del uso de la IHQ para detectar animales PI en biopsias de piel es la facilidad de la toma de muestra y transportación al laboratorio, así como el bajo costo, entre otras, en comparación con el aislamiento viral.^{1,17,23,25,28,29,31,34,36,37-43}

1.12.4 Otros métodos de diagnóstico

Algunos otros métodos utilizados para el diagnóstico de DVB son: Hibridación *in situ*, amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y pruebas de seroneutralización, entre otras.^{34,36,37-43}

2. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo propone la utilización y adecuación de la IHQ, método de diagnóstico poco común en nuestro país, el cual además de permitir una detección temprana de animales PI con el VDVB requiere de un manejo sencillo en la obtención de la muestra (biopsia de piel). La identificación de los animales PI a través de ELISA de captura de antígeno tradicionalmente se realiza entre los cuatro y los seis meses de edad, lo que trae como consecuencia grandes pérdidas económicas, que podrían reducirse al utilizar la IHQ para el diagnóstico de esta entidad en animales más jóvenes.

3. OBJETIVO GENERAL

Detectar becerros persistentemente infectados por el virus de Diarrea Viral Bovina a través de inmunohistoquímica y ELISA de captura de antígeno y comparar los resultados.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar animales persistentemente infectados con VDVB de hasta 3 meses de edad, realizando la prueba de inmunohistoquímica en biopsias de piel y mediante ELISA de captura de antígeno.
2. Comparar los resultados de ambas técnicas en la detección de animales persistentemente infectados con VDVB.
3. Determinar la localización de la inmunopositividad en las biopsias de piel.

5. HIPÓTESIS

El número de becerros PI detectados con IHQ y ELISA de captura será similar.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en marzo del 2004 en tres diferentes establos de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo. Esta región tiene un clima Cb (wo) (e) g (clima templado seco extremoso con verano fresco y con lluvias antes del 21 de julio); la precipitación pluvial anual es de 611.2 mm y la temperatura anual promedio es de 15.6° C.⁴⁴

6.1 Grupo de animales.

Se incluyeron 80 becerras de la raza Holstein, menores a 3 meses de edad provenientes de hatos lecheros con antecedentes previos de Diarrea Viral Bovina, las cuales no estaban vacunadas.

6.2 Muestras para ELISA.

Se obtuvo sangre por punción de la vena yugular o caudal utilizando aguja de calibre 18 y tubo vacutainer sin anticoagulante. Posteriormente las muestras se dejaron en reposo 12 horas a temperatura ambiente, con una inclinación de 45° para obtener el suero y realizar la prueba de ELISA de captura de antígeno.

6.3 Muestras para Inmunohistoquímica.

Al mismo tiempo, de la toma de sangre se realizaron biopsias de piel de oreja para lo cual se utilizó un “muesqueador”, obteniendo un fragmento de tejido de 1 x 0.8 x 0.4 cm aproximadamente, que se depositó en tubos vacutainer reciclados que contenían formalina al 10%, a pH de 7.4 permitiendo su fijación durante 24 horas a temperatura ambiente.

6.4 Prueba de ELISA.

Para la detección de antígeno del Virus de Diarrea Viral Bovina en el suero de las becerras, se realizó la técnica de ELISA de captura de antígeno utilizando

los reactivos y el método Antigen Test Kit/Serum de laboratorios IDEXX, donde el punto de corte fue de 0.300.^{A.}

6.5 Método de Inmunohistoquímica

Para identificar el antígeno viral presente en la piel de oreja de las becerras se utilizó la técnica de Inmunohistoquímica con el método de detección Complejo Estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa (CAB-P).⁴⁵

6.5.1 Tejidos utilizados como testigos

6.5.1.1 Testigo positivo.

Se utilizó una sección de intestino delgado el cual fue positivo para este virus a través de la técnica de inmunohistoquímica (figura 1).^{*} Asimismo se utilizó piel de oreja positiva al VDVB por inmunohistoquímica (figura 2).^{**}

6.5.1.2 Testigo negativo.

Como testigo negativo se utilizaron cortes de los mismos tejidos en los cuales se sustituyó el anticuerpo primario por solución TRIZ (figuras 3 y 4).

6.5.2 Procesamiento del tejido.

Una vez fijadas las muestras de piel se realizaron cortes 3 mm de grosor de cada una de ellas siguiendo la orientación del pelo, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 3 μ m de grosor utilizando un microtomo estándar. Los cortes de cada tejido se montaron en laminillas tratadas previamente con Poli-L-lisina al 3% diluida en acetona. Posteriormente las laminillas se desparafinaron por una hora a 60°C y se realizaron dos lavados con xilol de 20 minutos cada uno. Para la rehidratación de los tejidos se utilizó etanol a

^{A.} Antigen Test kit/Serum. IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, Maine 04092, USA. 0080072743399.

^{*} Donado por el Doctor Alfonso López Mayagoitia de la Universidad de la Isla del Príncipe Eduardo, Canadá.

^{**} Donado por el Doctor Javier Lértora de la Universidad Austral de Chile.

concentraciones de mayor a menor de (100, 96, 80 y 50%) y agua destilada. En todos los casos se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno.

6.5.3 Inhibición de la peroxidasa endógena

Para inhibir la peroxidasa endógena se trataron las laminillas con una solución de peróxido de hidrógeno al 30%^a y metanol absoluto^b a una relación de 1:8, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos con solución de TRIZ^c a un pH de 7.6.

6.5.4 Recuperación de antígenos

Para la recuperación de antígenos las laminillas se trataron con solución Dako Target Retrieval^d diluida en TRIZ a una proporción de 1:40 y se sometieron a tratamiento físico (calor) en un horno de microondas convencional marca Sanyo, modelo No. EMA-108s, a potencia cuatro por 3'30". Inmediatamente se cambio a TRIZ frío para detener la reacción.

6.5.5 Bloqueos de avidina y biotina endógena

Para bloquear la avidina y la biotina endógenas en los tejidos se utilizó la solución bloqueadora de avidina y biotina^e, la cantidad utilizada para cada una de ellas fue de 20µL incubándose a temperatura ambiente en cámara húmeda por 45 minutos, entre cada solución se realizaron 3 lavados con TRIZ de 5 minutos cada uno.

^a JT Baker. Catálogo 218601. Estado de México. México. Tel: 55691100

^b Técnica Química. Catálogo A1760. D.F. México. Tel: 56700506

^c Sigma-Aldrich. Cat. T1503. P.O. Box 14508 St. Louis M.O. 63178 USA. Phone: 3147715750

^d Dako Corporation. Cat. 51694. Carpintería CA 43013 USA

^e ZYMED. Cat. 95-6543B. San Francisco California USA. Phone: (650) 871-4494

6.5.6 Bloqueo con suero de cabra

Para bloquear la adherencia no específica por parte del anticuerpo secundario y primario se utilizó suero de cabra no inmune^f, aplicando 50µL sobre los tejidos, dejándolos incubar por una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. En este caso sólo se retiró el exceso sin realizar lavados.

6.5.7 Aplicación de anticuerpo primario

Se utilizaron 50µL de anticuerpo primario monoclonal (gp53/E2) anti-VDVB a una dilución de 1/150 hecho en ratón^g diluido en TRIZ. Posteriormente las laminillas se incubaron durante 12 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de esta incubación los tejidos fueron sometidos a 3 lavados de 5 minutos cada uno con TRIZ.

6.5.8 Aplicación de anticuerpo secundario

Se aplicaron 50µL de proteína G^h como anticuerpo secundario biotinilado a una dilución de 1/100, diluido en TRIZ. Las laminillas se incubaron durante una hora y media en cámara húmeda a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con TRIZ de 5 minutos cada uno para eliminar el exceso de anticuerpo.

6.5.9 Aplicación de la Estreptoavidina

Se aplicaron 20µL de estreptoavidinaⁱ y se dejó incubar durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente y al final también se realizaron 3 lavados con TRIZ de 5 minutos cada uno.

^f ZYMED. Cat. 95-6543B. San Francisco California USA. Phone: (650) 871-4494

^g Anti BVD Antisuero. VMRD, Inc. P.O. Box 502, Pullman, WA99163, USA. Phone 1 (509) 334-5815

^h ZYMED. Cat. 101211. San Francisco California USA. Phone: (650) 871-4494

ⁱ ZYMED. Cat. 95-6543B. San Francisco California USA. Phone: (650) 871-4494

6.5.10 Revelado

Para determinar la presencia o ausencia de antígeno en los tejidos se utilizó una prueba comercial de revelado^j que consta de cromógeno (aminoetilcarbazol), sustrato de buffer y peróxido de hidrógeno al 0.6%, el cual se preparó colocando una gota de cada uno de los reactivos en un mL de agua destilada. A cada tejido se aplicaron 50µL de esta mezcla durante 1.5 a 2 minutos. Para detener la reacción las laminillas se colocaron en agua destilada durante 5 minutos.

6.5.11 Tinción con Hematoxilina de Meyer^k

Para contrastar la coloración obtenida por el aminoetilcarbazol se utilizó hematoxilina de Meyer aplicando 40µL durante 4 minutos. Finalmente a los tejidos se les colocó un cubreobjetos sellado con resina acuosa^l.

6.5.12 Interpretación de resultados

Los tejidos se consideraron inmunopositivos al detectar gránulos intracitoplasmáticos de color café rojizo en epidermis, folículos pilosos o células mononucleares y se clasificaron en tres grados (leve, moderado o fuertemente inmunopositivo), de acuerdo a la intensidad de la reacción.

6.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de χ^2 de homogeneidad utilizando el programa estadístico SAS.⁴⁶

^j ZYMED. Cat. 00-2007. San Francisco California USA. Phone: (650) 871-4494

^k ZYMED. Cat. 008001. San Francisco California USA. Phone: (650) 871-4494.

^l ZYMED. Cat. 95-6543. San Francisco California USA. Phone: (650) 871-4494

RESULTADOS

De las 80 biopsias de piel de oreja que fueron sometidas a la técnica de IHQ con el método de detección estreptoavidina-biotina-peroxidasa, sólo 15% fueron diagnosticados positivos (inmunopositividad en grado moderado). Los sitios en donde la inmunopositividad se encontró en general, fueron células mononucleares de la dermis, células epiteliales de la epidermis y folículos pilosos (cuadro 5).

En los 80 sueros de las becerras previamente analizadas por IHQ, no se logró detectar antígeno del VDVB mediante la prueba de ELISA de captura de antígeno al utilizar el punto de corte de 0.300 (cuadro 5).

Los resultados del diagnóstico obtenido mediante la técnica de ELISA de captura de antígeno y la técnica de IHQ, analizados por la prueba de χ^2 de homogeneidad se resumen en el cuadro 6, en donde se encontró evidencia significativa de que la capacidad para detectar animales PI mediante la técnica de ELISA de captura de antígeno y la IHQ es diferente, $P (<0.01)$ con 15% de animales diagnosticados positivos.

Inmunopositividad

La inmunopositividad (casos positivos), obtenida en la prueba de IHQ se resume en el cuadro 7, cabe aclarar que los animales sólo mostraron inmunopositividad moderada. Referente a la localización histológica de dicha inmunopositividad, se encontró que en 2 casos de los 12 totales, esto se observó solo positivo para epitelio (epidermis y folículos pilosos), en 5 sólo se presentó positivo para células mononucleares y el resto (5) se apreció positivo para ambos (epitelio y células mononucleares).

DISCUSIÓN

Los animales PI constituyen grandes pérdidas económicas para los productores, ya que la mayoría no manifiestan signos clínicos y es hasta los cuatro meses cuando se realizan pruebas diagnósticas tradicionales como la detección de anticuerpos por ELISA o el aislamiento viral en busca de animales infectados.

De acuerdo a algunos estudios, la IHQ en biopsias de piel ha constituido un método de diagnóstico alternativo que ha demostrado ser útil en la detección de animales PI, ya que se puede realizar desde los primeros días de vida, la toma de muestra es relativamente fácil y no requiere refrigeración o medios especiales para su transporte, además de ser relativamente barata. El presente estudio es el primero que se realiza en México utilizando esta técnica.

Los resultados obtenidos en el presente estudio utilizando la IHQ y la ELISA de captura de antígeno en suero mostraron diferencias significativas ($P < 0.01$) en la detección de animales PI concluyéndose que la IHQ fue más eficiente que la ELISA ya que detectó 15% de animales infectados.

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Brodersen²⁴ y colaboradores, quienes en 1996 realizaron un estudio utilizando 37 bovinos, de los cuales 15 fueron positivos por IHQ y de estos solo 13 fueron positivos por ELISA de captura de antígeno en suero. En los dos bovinos que resultaron negativos por ELISA se decidió hacer el aislamiento viral en el que se logró demostrar la presencia del virus. Por otro lado Grooms y Keilen¹⁸ quienes realizaron una investigación con 332 becerros de entre 1 y 4 semanas de edad obteniendo sangre y biopsias de piel de oreja de estos animales, encontraron que 6 (1.8%) fueron positivos tanto por aislamiento viral como por IHQ, por lo que

concluyeron que la IHQ fue un método sensible y adecuado en la detección de animales PI. En otro estudio Njaa²² y colaboradores utilizaron la prueba de IHQ a partir de biopsias de piel de diferentes regiones corporales de 42 animales diagnosticados como PI por aislamiento viral, encontrando inmunopositividad en 41 de ellos (97.6%). Los resultados de IHQ de estos estudios son semejantes a los resultados obtenidos en el presente estudio, poniendo de manifiesto la eficiencia de la IHQ para el diagnóstico de animales PI.

Cabe señalar que Cornish³⁵ y colaboradores, encontraron a diferencia del presente estudio, que la ELISA de captura y la IHQ eran capaces de detectar al 100% de los animales PI. El hecho de que ambos métodos de diagnóstico hayan tenido la misma sensibilidad puede deberse a que las pruebas de ELISA de captura de antígeno fueron realizadas a partir de biopsias de piel de la oreja y no en el suero como en el presente estudio. Recientemente, se ha utilizado la prueba de ELISA de captura de antígeno en biopsias de piel la cual también está indicada para detectar antígenos virales en el suero, sangre y plasma.⁴⁷ Una ventaja de esta prueba es que solo se requiere de una pequeña muestra de oreja. Según otro estudio realizado por Kuhne⁴⁸ y colaboradores este método fue igual de sensible que la IHQ al utilizar animales positivos diagnosticados por aislamiento viral, encontrando una sensibilidad de 100% y una especificidad de 99% para la prueba de ELISA en piel. Dentro de las desventajas que se mencionan en la utilización de éste método se encuentran: la interferencia de los anticuerpos maternos en la identificación del antígeno, la conservación de la muestra, ya que si no se realiza la prueba en un lapso corto después de la obtención de la muestra, esta debe refrigerarse o congelarse y

se debe realizar una segunda ELISA o algún otro método diagnóstico para diferenciar entre animales PI o con infección aguda.

En el presente estudio, la inmunopositividad en la piel de todos los casos fue moderada, a diferencia de la observada por Brodersen²⁴, Grooms¹⁸, Njaa²² y Cornish³⁵, quienes obtuvieron una inmunopositividad marcada; esto puede deberse a que en estos casos se utilizó el anticuerpo monoclonal 15c5, el cual ha mostrado tener muy buenos resultados para biopsias de piel, y en el presente estudio se utilizó el anticuerpo monoclonal gp53E2. Probablemente las variaciones en los resultados de la IHQ están relacionadas con las características del anticuerpo primario utilizado, el sistema de detección, el método de recuperación antigénica, el tiempo de fijación de los tejidos y el método de IHQ utilizado, además de la interpretación del patólogo. Cabe señalar que el grado de inmunopositividad no interfiere con el diagnóstico, ya que el animal es considerado como negativo o positivo y por lo tanto PI independientemente de si la inmunopositividad es leve, moderada o marcada.

En el presente estudio, la inmunopositividad se observó en las estructuras y células esperadas (epidermis, folículos pilosos y células mononucleares), confirmando la preferencia del virus por estas células. Esta puede ser la explicación del porqué algunos animales infectados presentan hipotricosis y/o alopecia. Es importante señalar que en el caso de animales no PI que se infectan después del nacimiento no siempre es posible observar la inmunopositividad en piel y cuando esta presente es leve e inespecífica. Al parecer, hoy en día, no se conoce con exactitud en que día post-infección el virus es capaz de alcanzar la piel.

Algunos estudios indican que el porcentaje de animales PI en los hatos generalmente es bajo (1%). Sin embargo, también se ha informado de hatos con una seroprevalencia de más del 20%. En el presente estudio se encontró un 15%, aunque este se realizó únicamente en 80 becerras.

La identificación y eliminación de los animales persistentemente infectados resulta de gran importancia ya que dichos animales constituyen la principal fuente de infección del virus dentro de los hatos. El 50% de estos animales puede alcanzar la edad reproductiva llegando a producir generaciones completas de animales PI que además estarán en riesgo de desarrollar la enfermedad de las mucosas. Asimismo, se encuentran en mayor riesgo de presentar infecciones secundarias por otros microorganismos, debido al poder inmunosupresor del virus.

CONCLUSIONES

La IHQ permite detectar animales PI desde la primera semana de vida, siendo más sensible que la ELISA de captura de antígeno en suero.

La inmunopositividad se encontró en las estructuras y células esperadas (epidermis, folículos pilosos, células mononucleares).

Se sugiere la utilización de la IHQ como un método de diagnóstico eficaz, ya que ha demostrado ser útil en la identificación temprana de animales PI.

Se sugiere realizar más estudios utilizando la prueba de ELISA en biopsias de piel de la oreja ya que puede constituir además de la IHQ un método de diagnóstico alternativo en la identificación de animales PI, que al igual que esta última resultaría económica, práctica y rápida.

REFERENCIAS

1. Radostits O M, Littlejohns I R. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the Bovine Viral Diarrhea Virus. *Can Vet J* 1988; 29: 513-528.
2. Baker J C. Bovine Viral Diarrhea Virus: A review. *JAVMA* 1987; 190: 1449-1458.
3. Brock K V. The many faces of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2004; 20: 1-5.
4. Donis R O. Molecular biology of Bovine Viral Diarrhea Virus and its interactions with the host. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 1995; 11: 393-423.
5. Bolin S R, Grooms D L. Origination and consequences of Bovine Viral Diarrhea Virus diversity. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2004; 20: 51-68.
6. Tremblay R. Transmission of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Med* 1996; 9: 858-866.
7. Brownlie J, Thompson I, Curwen A. Bovine Virus Diarrhea Virus, strategic decisions for diagnosis and control. *In Practice* 2000; 4: 176-187.
8. Potgieter L N. Immunology of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 1995; 11: 501-520.
9. Fulton R W, Saliki J T, Confer A W, Bolin S R. 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* 2000; 12: 333-38.

10. Van Regenmortel H V, Bishop D H, Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Academic Press 2000.
11. Marshall D J, Moxley R A, Kelling C L. Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Pathol* 1996; 33: 311-318.
12. Baszler T V, Evermann J F, Kaylor P S, Byington T C, Dilbeck P M. Diagnosis of naturally occurring Bovine Viral Diarrhea Virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. *Vet Pathol* 1995; 32: 609-618.
13. Corapi W V, Donis R O, Dubovi E J. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res* 1990; 51: 1388-1394.
14. Campbell J R. Effect of Bovine Viral Diarrhea Virus in the feedlot. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2004; 20: 39-50.
15. Baker J C. The clinical manifestations of Bovine Viral Diarrhea Infection. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 1995; 11: 425-443.
16. Bielefeldt H O. The pathologies of Bovine Viral Diarrhea Virus infection. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 1995; 11: 447-476.
17. Houe H. Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 1995; 11: 521-547.

18. Grooms D L, Keilen E D. Screening of neonatal calves for persistent infection with Bovine Viral Diarrhea Virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin Diag Lab Imm* 2002; 9: 898-900.
19. Brock K V, Grooms D L, Ridpath J, Bolin S R. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10: 22-26.
20. Wittum T E, Grotelueschen D M, Brock K V, Kvasnicka W G, Floyd J G, Kelling C L, Odde K G. Persistent Bovine Viral Diarrhoea Virus infection in US beef herds. *Prev Vet Med* 2001; 49: 83-94.
21. Larson R L, Pierce V L, Grotelueschen D M, Wittum T E. Economic evaluation of beef cowherd screening for cattle persistently-infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. *Bov Prac* 2002; 36: 106-112.
22. Njaa B L, Clark E G, Janzen E, Ellis J A, Haines D M. Diagnosis of persistent Bovine Viral Diarrhea Virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J Vet Diagn Invest* 2000. 12: 393-399.
23. Grooms D L. Reproductive consequences of infection with Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2004; 20: 5-20.
24. Brodersen B W. Immunohistochemistry used as a screening method for Persistent Bovine Viral Diarrhea Virus infection. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2004; 20: 85-94.
25. Moennig V, Liess B. Pathogenesis of intrauterine infections with Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 1995; 11: 477-487.

26. Bielefeldt H. BVD Virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: implications for the pathogenesis of clinically fatal disease. *Acta Vet Scand* 1988;29: 77-84.
27. Ellis J A, West K H, Cortese V S, Myers S L, Carman S, Martin K M, Haines D M. Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent Bovine Viral Diarrhea Virus-Type II. *Can J Vet Res* 1998; 62: 161-169.
28. Bolin S R. The pathogenesis of mucosal disease. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 1995; 11: 489-500.
29. Rivera H G, Benito Z A, Chacón J V. Distribución del virus de la Diarrea Viral Bovina en tejidos de un bovino persistentemente infectado. *Rev Virt Vis Vet* 2001; 1: 1-5.
30. Shin T, Acland H. Tissue distribution of Bovine Viral Diarrhea Virus antigens in persistently infected cattle. *J Vet Sci* 2001; 2: 81-84.
31. Odeón A C, Risatti G, Kaiser G G, Leunda M R, Odriozola E, Campero C M, Donis R O. Bovine Viral Diarrhea Virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Vet Microbiol* 2003; 96: 133-144.
32. Saliki J T, Dubovi E J. Laboratory diagnosis of Bovine Viral Diarrhea Virus infections. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2004; 20: 69-84.
33. Kelling C L. Evolution of Bovine Viral Diarrhea Virus vaccines. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2004; 20: 115-130.
34. Evermann J F, Berry E S, Baszler T V, Lewis T L, Byington T C, Dilbeck P M. Diagnostic approaches for the detection of Bovine Viral Diarrhea

- (DVB) virus and related pestiviruses. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 265-269.
35. Cornish T E, Van Olphen A L, Cavender J L, Edwards J M, Jaeger P T, Woodard L F, Miller R D. Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 110-117.
36. Bitsch V, Ronsholt L, Control of Bovine Viral Diarrhoea Virus infection without vaccines. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 1995; 11: 627-640.
37. Thur B, Zlinszky K. Immunohistochemical detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus in skin biopsies: a reliable and fast diagnostic tool. *Zentralbl Veterinarmed B* 1996; 43: 163-166.
38. Dubois W R, Cooper V L, Duffy J C, Dean D D, Ball R L, Starr B D. A preliminary Evaluation of the effect of vaccination with modified live Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) on detection of BVDV antigen in skin biopsies using immunohistochemical methods. *Bov Pract* 2000; 34: 98-100.
39. Ridpath J F, Hietala S K, Sorden S, Neill J D. Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute Bovine Viral Diarrhoea infections. *J vet Diagn Invest* 2002; 14: 303-307.
40. Smith D R, Grotelueschen D M. Biosecurity and biocontainment of Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2004; 20: 131-150.

41. Sandvik T. Progress of control and prevention programs for Bovine Viral Diarrhea Virus in Europe. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2004; 20: 152-170.
42. Brock K V. Strategies for the control and prevention of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2004; 20: 171-180.
43. Lertora J. Inmunohistoquímica en biopsias de piel y bulbos pilosos para el diagnóstico de bovinos persistentemente infectados con el Virus de Diarrea Viral Bovina (tesis de maestría). Chile (valdivia). Chile: Universidad Austral de Chile (UACH), Facultad de Ciencias Veterinarias. 2002.
44. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kôppen. 4^{ta} ed. México (DF): SIGSA 1988.
45. Haines D M, Chelack B J. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3:101-112.
46. Wayne D W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la Salud. 4^{ta} ed. México (DF). Limusa Wiley 2002.
47. Virus Antigen/ Serum Test kit. IDEXX HerdChek. European Headquarters. Schiphol-Rijk, Noord-Holland 119 NE. The Netherlands.
48. H Kuhne S, Schroeder G, Holmquist G, Wolf S, Horner G, Ballagi A. Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus infected cattle—testing tissue samples derived from ear tagging using an E^{ms} capture ELISA. *Journal of veterinary medicine series B* 2005; 52:272.

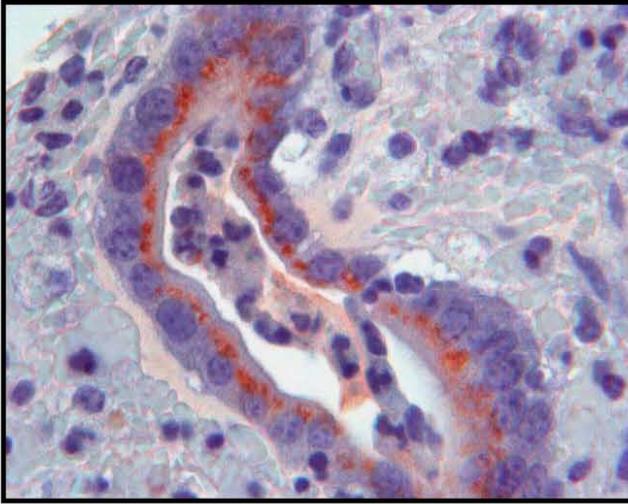


Figura 1. Testigo positivo de intestino. Inmunopositividad marcada en cripta intestinal. Técnica de IHQ (CAB-P 40x)

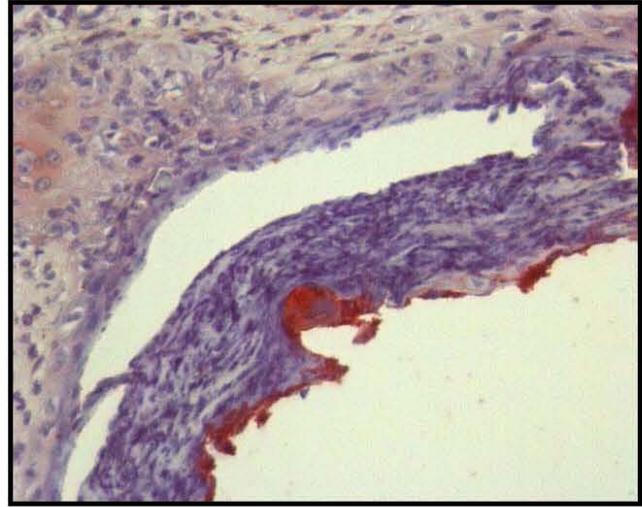


Figura 2. Testigo positivo de piel de oreja. Inmunopositividad moderada en queratinocitos. Técnica de IHQ (CAB-P 40x)

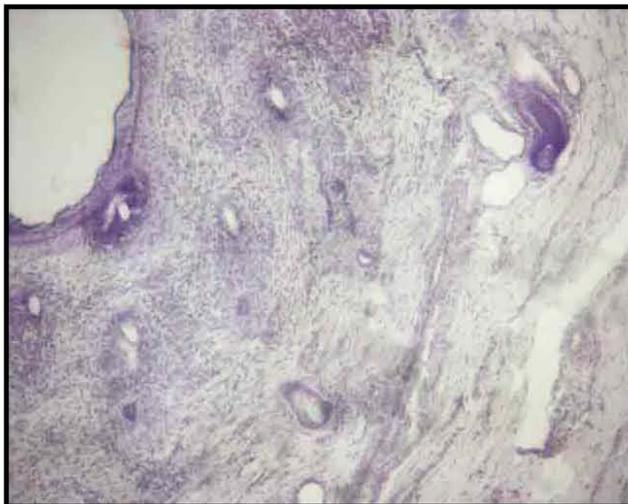


Figura 3. Testigo negativo de piel de oreja. Técnica de IHQ (CAB-P 40x)

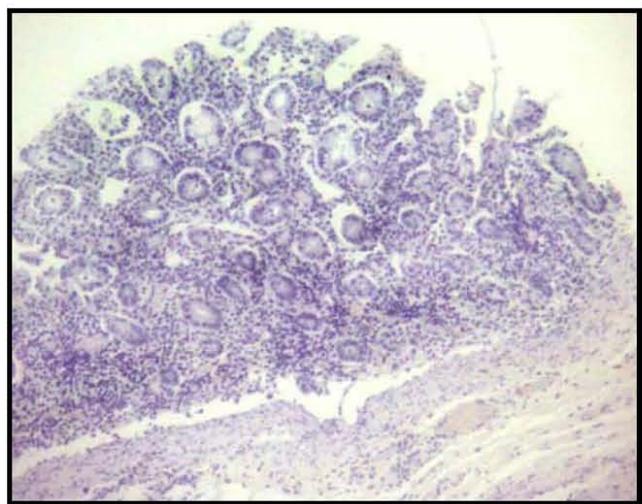


Figura 4. Testigo negativo de intestino. Técnica de IHQ (CAB-P 40x)

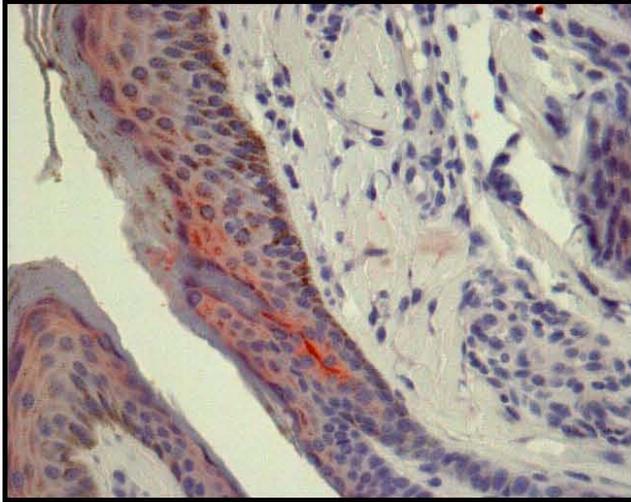


Figura 5. Piel de oreja. Inmunopositivity moderada en epidermis y folículos pilosos. Técnica de IHQ (CAB-P 10x)

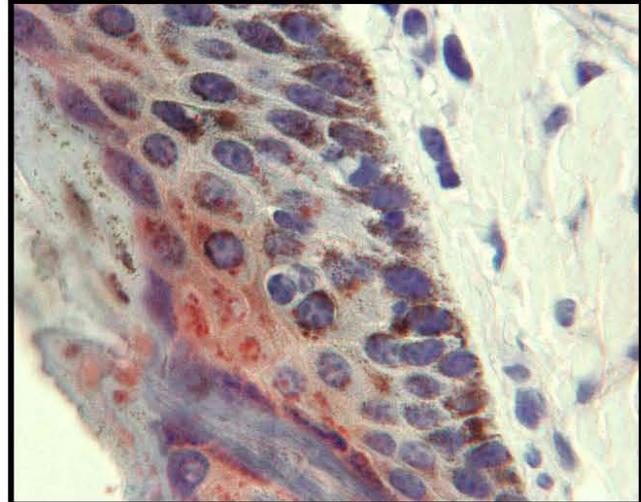


Figura 6. Piel de oreja. Inmunopositivity moderada en epidermis. Técnica de IHQ (CAB-P 40x)

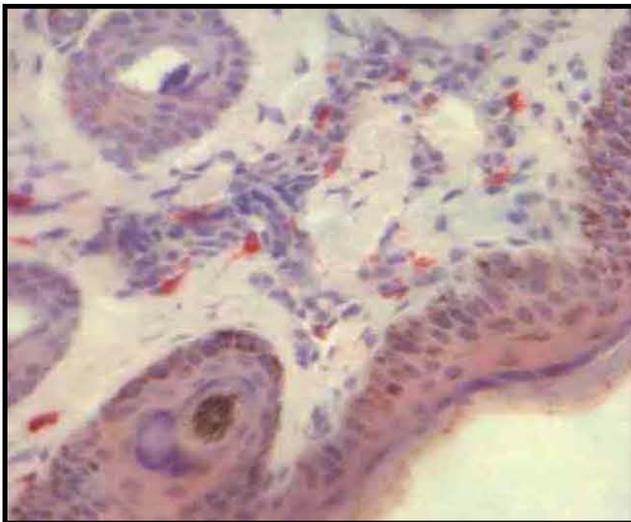


Figura 7. Piel de oreja. Inmunopositivity moderada en células mononucleares de la dermis. Técnica de IHQ (CAB-P 10x)

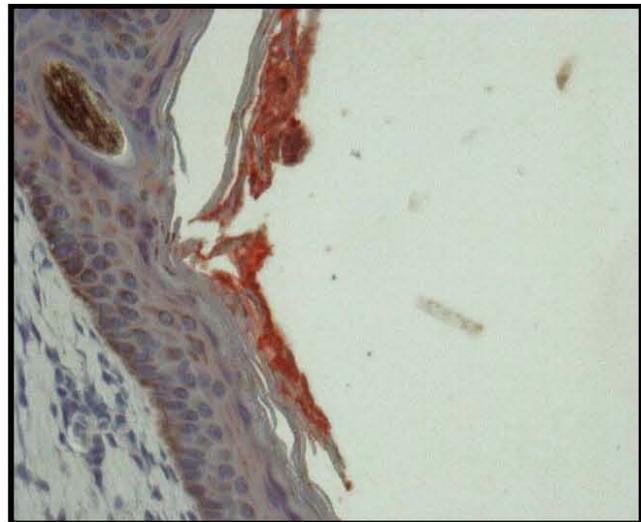


Figura 8. Piel de oreja. Inmunopositivity moderada en queratinocitos. Técnica de IHQ (CAB-P 10x)

Cuadro 1. Infecciones con el VDVB en animales inmunocompetentes no preñados

| Tipo de Infección | Hallazgos clínicos y lesiones. | Diagnóstico |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ◆ Infección subclínica/ ◆ Diarrea Viral Bovina clínica | <ul style="list-style-type: none"> ◆ Fiebre, leucopenia, disminución de la producción láctea. ◆ Depresión, anorexia, descarga oculonasal, erosiones y úlceras orales, diarrea, disminución de la producción láctea. | <ul style="list-style-type: none"> ◆ Aislamiento viral ◆ Seroconversión |
| <ul style="list-style-type: none"> ◆ Síndrome hemorrágico | <ul style="list-style-type: none"> ◆ Diarrea sanguinolenta, hemorragias en mucosas, fiebre, leucopenia y trombocitopenia. | <ul style="list-style-type: none"> ◆ Aislamiento viral ◆ Seroconversión |
| <ul style="list-style-type: none"> ◆ Diarrea Viral Bovina Crónica | <ul style="list-style-type: none"> ◆ Diarrea, fiebre úlceras orales, neumonía, abortos, disminución de la producción láctea | <ul style="list-style-type: none"> ◆ Aislamiento viral ◆ Seroconversión |

Baker J C. Vet Clin N Am Food Anim Pract 1995; 11: 425-443.

Cuadro 2. Infecciones con el VDVB en hembras inmunocompetentes gestantes (infección fetal)

| Etapa de gestación (días) | Alteraciones en el feto |
|---------------------------|--|
| ✦ Día 0-50 | ✦ Muerte fetal y reabsorción. ✦ Abortos |
| ✦ Día 50-100 | ✦ Muerte fetal ✦ Defectos congénitos |
| ✦ Día 120-200 | ✦ Animales persistentemente infectados |
| ✦ Después del día 200 | ✦ Nacimiento de animales normales |

Baker J C. Vet Clin N Am Food Anim Pract 1995; 11: 425-443.

Cuadro 3. ALTERACIONES CONGÉNITAS ASOCIADAS CON VDVB

| Sistema Nervioso | Ojo | Sistema Músculo-Esquelético | Piel | Sistema Inmune | Sistema Respiratorio |
|---|---|--|--|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ♦Microencefalopatia ♦Hipoplasia cerebelar ♦Hidranencefalia ♦Porencefalia ♦Hidrocefalia ♦Hipomielinogenesis | <ul style="list-style-type: none"> ♦Atrofia y displasia de la retina ♦Neuritis óptica ♦Microftalmia cataratas ♦Queratitis intersticial | <ul style="list-style-type: none"> ♦Braquignatia ♦Retraso del crecimiento ♦Artrogrifosis ♦Defectos óseos | <ul style="list-style-type: none"> ♦Hipotricosis ♦Alopecia | <ul style="list-style-type: none"> ♦Hipoplasia del timo | <ul style="list-style-type: none"> ♦Hipoplasia pulmonar |

Baker J C. Vet Clin N Am Food Anim Pract 1995; 11: 425-443.

Cuadro 4. LOCALIZACIÓN DEL ANTÍGENO DE VDVB EN ANIMALES PI POR IHQ SIN ENFERMEDAD CLÍNICA

| TEJIDO | TIPO DE CÉLULAS |
|-----------------------------------|--|
| ▪Piel | ▪Queratinocitos |
| ▪Pulmón | ▪Células epiteliales bronquiolares y alveolares |
| ▪Gíngiva, labios y lengua | ▪Queratinocitos y macrófagos en submucosa |
| ▪Esófago, rumen y omaso | ▪Queratinocitos |
| ▪Abomaso | ▪Células epiteliales de la mucosa y células linfoides de la lámina propia |
| ▪Íleon | ▪Células epiteliales aisladas, células linfoides de la lámina propia |
| ▪Colon y recto | ▪Células linfoides de la lámina propia |
| ▪Glándulas salivales | ▪Células acinares |
| ▪Riñones | ▪Células del epitelio tubular |
| ▪Tonsilas | ▪Queratinocitos y células linfoides |
| ▪Timo | ▪Timocitos, macrófagos y células interdigitadas |
| ▪Bazo, linfonodo, placas de Peyer | ▪Linfocitos, macrófagos, células interdigitadas y células dendríticas de los folículos |

Bielefeldt H O. Vet Clin N Am Food Anim Pract 1995; 11: 447-476.

Cuadro 5. CASOS POSITIVOS POR IHQ: GRADO Y LOCALIZACIÓN DE LA INMUNOPOSITIVIDAD

| Identificación del animal | Grado de inmunopositividad | Localización de la innumopositividad | |
|---------------------------|----------------------------|---|-----------------------|
| | | Epitelio (epidermis, folículos pilosos) | Células mononucleares |
| 99 | Moderado | Si | Si |
| 1968 | Moderado | No | Si |
| 128 | Moderado | Si | No |
| 125 | Moderado | Si | Si |
| 107 | Moderado | Si | Si |
| 78 | Moderado | Si | No |
| 138 | Moderado | No | Si |
| 113 | Moderado | Si | Si |
| 1872 | Moderado | Si | Si |
| 1516 | Moderado | No | Si |
| 103 | Moderado | No | Si |
| 130 | Moderado | No | Si |

Cuadro 6. RESULTADO DE LAS BECERRAS ANALIZADAS con IHQ Y ELISA DE CAPTURA DE ANTÍGENO (solo se muestran las que resultaron positivas para alguna de las dos pruebas).

| No. de caso | Identificación del animal | Resultado IHQ | Resultado ELISA |
|--------------------|----------------------------------|----------------------|------------------------|
| 5 | 113 | Positivo | Negativo |
| 8 | 78 | Positivo | Negativo |
| 9 | 99 | Positivo | Negativo |
| 12 | 138 | Positivo | Negativo |
| 14 | 125 | Positivo | Negativo |
| 16 | 128 | Positivo | Negativo |
| 18 | 107 | Positivo | Negativo |
| 21 | 1872 | Positivo | Negativo |
| 22 | 103 | Positivo | Negativo |
| 23 | 130 | Positivo | Negativo |
| 28 | 1516 | Positivo | Negativo |
| 30 | 1968 | Positivo | Negativo |

Cuadro 7 Tabla de frecuencias para las pruebas de diagnóstico IHQ y ELISA Ag.

| P R U E B A | D I A G N Ó S T I C O | |
|--------------------|------------------------------|------------------|
| | NEGATIVOS | POSITIVOS |
| IHQ | 68 85% | 12 15% |
| ELISA Ag | 80 100% | 0 0% |

IHQ= Inmunohistoquímica

ELISA= Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima