

Transmisión experimental del virus de la diarrea viral bovina, de vacunos seropositivos portadores a ovinos*

Gogorza, L.; Morán, P.; Esteban, E.

Area Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Paraje Arroyo Seco s/n, Tandil (7000), Argentina.
Tel.: 02293-439850. E-mail: lgogorza@vet.unicen.edu.ar

Resumen

Gogorza, L.; Morán, P.; Esteban, E.: *Transmisión experimental del virus de la diarrea viral bovina, de vacunos seropositivos portadores a ovinos.* Rev. vet. 18: 2, 102–105, 2007. El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) causa importantes pérdidas económicas en la industria ganadera a nivel mundial. Los programas de control de la infección se basan principalmente en identificar y eliminar los animales persistentemente infectados de los rodeos. Se considera que en los animales inmunocompetentes, el BVDV induce una enfermedad leve y una rápida respuesta inmune que produce la eliminación del virus, por lo cual estos animales no son considerados de riesgo epidemiológico. No obstante, en trabajos previos de nuestro grupo, se detectaron bovinos seropositivos portadores del BVDV, por lo cual se consideró de interés evaluar experimentalmente el rol de estos animales en la transmisión viral. Catorce corderos seronegativos al BVDV fueron inoculados con sangre de bovinos seropositivos portadores del virus. Mediante un ELISA de captura (cELISA-FCV) se determinó la expresión del BVDV en leucocitos de sangre periférica de los ovinos inoculados. La presencia de anticuerpos fue determinada mediante una técnica de seroneutralización *in vitro* combinada con cELISA-FCV. En dos corderos inoculados se detectaron leucocitos infectados y respuesta inmune a la infección. Tres corderos presentaron serología positiva sin expresión viral en los leucocitos y en los nueve ovinos restantes no se detectó actividad viral ni serología positiva. Los dos controles sin inocular no presentaron actividad viral ni respuesta inmune. Estos resultados sugieren la necesidad de profundizar los estudios sobre el rol de los bovinos seropositivos portadores en la epidemiología del BVDV.

Palabras clave: bovino, diarrea viral BVDV, portadores, transmisión a ovinos.

Abstract

Gogorza, L.; Morán, P.; Esteban, E.: *Experimental transmission of bovine viral diarrhoea virus, from virus carrying seropositive cattle to lambs.* Rev. vet. 18: 2, 102–105, 2007. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) causes important economic losses in livestock trade all over the world. BVDV control programs focus on identification and removal of persistently infected animals. In immunocompetent cattle, BVDV induces a mild disease and a fast immune response leading to clear the virus, thus they are allegedly non virus carrying and not considered an epidemiological risk. However, in previous studies, we detected seropositive cattle carrying BVDV, thus the objective of this work was the experimental evaluation of the potential role of these animals in the viral transmission across species. Fourteen BVDV seronegative lambs were inoculated with blood from seropositive cattle carrying virus. BVDV expression in peripheral blood leukocytes from inoculated ovines was detected by a capture ELISA (cELISA-FCV). Antibody titers were evaluated by seroneutralization on cell culture combined with cELISA-FCV. Infected leukocytes and immune response to the infection were detected in two inoculated lambs. Three lambs were seropositive, but virus in leukocytes was not detected. Neither virus nor BVDV antibodies were detected in nine ovines. The two uninoculated controls were negative for BVDV expression and antibody detection. These results support the need of further studies on the epidemiological role of virus carrying seropositive cattle.

Key words: cattle, viral diarrhoea BVDV, carriers, transmission to lambs.

* Proyecto H/197 SECAT.

Recibido: 11 setiembre 2007 / Aceptado: 5 octubre 2007

INTRODUCCIÓN

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) causa importantes pérdidas económicas en la industria ganadera a nivel mundial^{5,13}. Los programas para el control del BVDV, basados principalmente en la información obtenida de países europeos y de los Estados Unidos, enfatizan la detección de los animales persistentemente infectados (PI) y la inmediata eliminación de los mismos del rodeo. Además, recomiendan la aplicación de vacunas al resto de los animales, aún cuando no se cuenta a nivel mundial con un firme consenso respecto a su total eficiencia. A pesar de los esfuerzos realizados en el desarrollo de estrategias para el control de la infección, hasta el momento no parece haber métodos totalmente efectivos para controlar la actividad del BVDV en la población bovina^{6,7,14}.

La infección por BVDV produce generalmente manifestaciones clínicas leves en los animales inmunocompetentes, estimulando una respuesta inmune con seroconversión y posterior eliminación viral. Se considera entonces que una vez superado el cuadro clínico, el ganado seropositivo no es portador del virus¹², permaneciendo inmune a posteriores infecciones con la misma cepa de BVDV y sin actividad de riesgo epidemiológico en la transmisión¹⁵. Por el contrario, cuando un feto es infectado *in utero* entre los 30 y 120 días de gestación, se produce un estado de inmunotolerancia, con posibilidad de persistencia viral. Estos animales PI, juegan un rol clave en la epidemiología de la enfermedad, dado que ellos constituyen una fuente de diseminación viral permanente¹⁶.

Estos conceptos contribuyen a valorar la identificación de animales portadores del virus como una importante herramienta dentro de las medidas de control del BVDV⁹. Aún en ausencia de animales PI, en los rodeos cerrados es frecuente hallar serología positiva entre los animales jóvenes; es por ello que en los estudios epidemiológicos es importante considerar la búsqueda de fuentes alternativas de infección.

En trabajos realizados por nuestro grupo, se ha detectado la persistencia del BVDV tanto en los PI clásicos, como en un número importante de animales inmunocompetentes clínicamente sanos⁹. La presencia de estos bovinos seropositivos portadores del BVDV, generó el interés de evaluar su rol potencial como transmisores de la infección. La detección de animales portadores no PI es esencial para los mecanismos de control de la enfermedad; para ello se requiere disponer de técnicas de diagnóstico poblacional que permitan identificar a estos animales.

Utilizando técnicas desarrolladas a partir de pruebas convencionales disponibles, se detectó la presencia de bovinos seropositivos portadores en los rodeos analizados⁹. Estos animales se clasificaron en 4 categorías, denominadas condiciones I, II, III y IV, según los tratamientos realizados sobre las muestras de leucocitos de sangre periférica (LSP) para evidenciar la expresión del virus. Se interpretó que cada condición presentaría

una forma de control del virus por la respuesta inmune del hospedador⁹. Dado que el BVDV se transmite en forma vertical y horizontal, estos animales podrían diseminar el virus en el ambiente y transmitirlo a otros hospedadores susceptibles, dentro de los que se incluyen varias especies de rumiantes domésticos y silvestres^{3,4,18}.

El objetivo de este trabajo fue evaluar experimentalmente la capacidad de transmisión horizontal interespecies, a partir de bovinos seropositivos portadores del virus.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño. Un grupo de ovinos caracterizados previamente como seronegativos al BVDV, fue inoculado con sangre de bovinos seleccionados de cada una de las categorías mencionadas anteriormente. Mediante el cELISA-FCV se determinó la expresión del BVDV en LSP de los ovinos inoculados y el nivel de anticuerpos séricos fue determinado mediante la técnica de seroneutralización *in vitro* combinada con cELISA-FCV.

Animales y muestras clínicas. Se seleccionaron 7 bovinos seropositivos portadores, un animal de la condición I y dos animales de cada una de las condiciones restantes, de acuerdo a la clasificación obtenida^{9,10}. Las muestras de sangre periférica bovina fueron obtenidas por punción de la vena yugular y transportadas en tubos con 10% de citrato de sodio. Los ovinos utilizados fueron 16 corderos de raza Corriedale, clínicamente sanos y determinados seronegativos al BVDV mediante la técnica de seroneutralización viral *in vitro*² utilizando BVDV cepa Singer 10⁻³.

Virus y cultivos celulares. Se utilizó la línea celular Madin Darby bovine kidney (MDBK, Laboratorio de Virología, INTA Balcarce), cultivada en monocapa con Minimum Essential Medium (MEM) adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Las células MDBK y el SFB fueron analizadas con un equipo comercial de ELISA de captura (p80/120 BVDV antigen-Rhone Mérieux), para determinar su estado libre de BVDV. Para su monitoreo periódico durante el ensayo se utilizó el método cELISA-FCV¹⁰. El virus stock de BVDV cepa Singer (Laboratorio de Virología, INTA Castelar) se obtuvo luego de tres pasajes del virus sobre MDBK. La dosis infecciosa 50 sobre cultivo de tejido (TCDI₅₀) fue calculada por el método de Reed & Muench¹⁷.

ELISA de captura para antígeno de BVDV (cELISA-FCV). Para la detección de antígenos virales en el monitoreo del control de los cultivos celulares y en el diagnóstico de infección en los lisados celulares procedentes del co-cultivo de leucocitos de los ovinos en estudio con MDBK, se utilizó el método cELISA-FCV¹⁰.

Lisis de las células en estudio. Para obtener los extractos celulares, las células fueron lavadas con solución tamponada de fosfatos (PBS) y se agregaron 100 ul de solución tamponada hipotónica (0,02 M Tris – 0,02 M NaCl – 0,001 M EDTA). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agregaron

100 µl de solución de lisis (0,02 M Na Tris – 0,001 M EDTA- Np40 1%). Se incubaron 10 min, se congelaron y descongelaron dos veces. Se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron durante 1 min a 1.500 g. El sobrenadante fue colectado y conservado a -20°C hasta su uso.

Ensayo de transmisión experimental. Se inocularon 2 corderos por vía subcutánea con 2 ml de sangre entera fresca heparinizada de cada uno de los bovinos seleccionados. Se obtuvieron muestras de sangre de los ovinos inoculados, por punción de la vena yugular con y sin anticoagulante (10% de citrato de sodio) para la determinación de antígenos y anticuerpos, respectivamente ⁸. Las muestras se obtuvieron en el día 1 (pre-inoculación) y a los 30, 60, 90 y 120 días post-inoculación.

La detección de antígenos del BVDV se realizó según el protocolo aplicado para la determinación del estado de portador de los bovinos ¹⁰. La fracción LSP se obtuvo de la interfase leucocitaria mediante centrifugación de las muestras durante 20 min a 800 g a temperatura ambiente, en una solución de Ficoll Hypaque densidad 1,087 (Pharmacia Biotech code 17-0840-01) y aplicando la técnica de Boyun ¹. Las células obtenidas se lavaron 2 veces con PBS y fueron resuspendidas en MEM.

Los LSP fueron evaluados en número y viabilidad, mediante un ensayo de exclusión con naranja de acridina/bromuro de etidio. Toda muestra con viabilidad inferior al 90% fue descartada. Los LSP se co-cultivaron con células de la línea MDBK ⁹. Las monocapas

de cada pasaje fueron lisadas y analizadas por el cELISA-FCV. Para la titulación de anticuerpos se realizó una combinación de la técnica de seroneutralización convencional sobre MDBK seguida del cELISA-FCV utilizando los lisados celulares.

Los sueros ovinos fueron conservados a -20°C hasta su procesamiento. Las muestras de sueros ovinos se diluyeron 1/8, 1/16 y 1/32, en MEM con BVDV cepa Singer 10⁻³; se incubaron 30 min a 37°C y se inocularon sobre monocapas de MDBK en placas de 96 pocillos (COSTAR, Cambridge Ma., Cat # 3548). Luego de incubar durante 48 h a 37°C, se descartó el sobrenadante y se obtuvieron los extractos celulares por lisado. Como controles positivos y negativos se utilizaron lisados de células MDBK infectadas y no infectadas con BVDV cepa Singer 10⁻³. Los extractos celulares se analizaron con el cELISA-FCV ¹⁰.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los dos corderos inoculados con la sangre del bovino de condición I se detectaron leucocitos infectados a los 60 y 90 días post-inoculación y respuesta serológica a la infección a los 60, 90 y 120 días.

En tres de los cuatro corderos inoculados con sangre de los bovinos de condición II se detectaron anticuerpos entre los 30 y 90 días, pero no se encontró expresión viral en los leucocitos. En los ocho ovinos restantes inoculados con sangre de los bovinos de condición III y IV no se detectó actividad viral ni serología positiva en las muestras durante todo el período del

Tabla 1. Determinación de la presencia del virus de la diarrea viral bovina (BVDV) en leucocitos de sangre periférica (LSP) y respuesta serológica en ovinos inoculados con sangre de bovinos portadores seropositivos.

procedencia del inóculo (categoría del bovino)	ovino inoculado	detección de BVDV en LSP					serología BVDV				
		días post inoculación					días post inoculación				
		0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
I	1	-	-	+	+	-	-	-	1: 16	1: 8	1: 8
1	2	-	-	+	+	-	-	-	1: 16	-	-
II	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	4	-	-	-	-	-	-	1: 8	1: 8	-	-
II	5	-	-	-	-	-	-	1: 8	1: 8	-	-
3	6	-	-	-	-	-	-	-	-	1:16	-
III	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	control**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	control**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I-II-III-IV: categorías según los tratamientos realizados sobre las muestras de leucocitos de sangre periférica para evidenciar la expresión del virus. *resultado positivo según condición III de detección por c-ELISA FCV ¹⁰. **sin inocular.

estudio. Los dos controles sin inocular no presentaron actividad viral ni serológica (Tabla 1).

Los animales de condición I mantienen un equilibrio sumamente vulnerable con el virus. En estos animales, el BVDV se replica en un número importante de células mononucleares y a altos títulos ($\geq 1,5$ UV)⁸. La respuesta inmune no destruye las células infectadas porque no hay expresión de antígenos virales en la membrana celular^{11,19}. Sin embargo, si el título de anticuerpos neutralizantes se deprime, el BVDV se libera al espacio extracelular.

Los bovinos de condición I se asemejan al PI clásico, al presentar viremia en forma ocasional. De acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo, se detectó que la inoculación de sangre periférica de estos animales desarrolló infección en los ovinos. Por ello, consideramos que los animales de esta condición representan un potencial riesgo en la transmisión viral, siendo recomendable entonces, su detección y eliminación en los programas de control.

La condición II representa un nivel de control superior por parte de la respuesta inmune del hospedador. Aunque en estos animales se detectó la expresión viral en un número exiguo de células mononucleares, no hubo evidencias de diseminación viral de célula a célula *in vivo*¹⁰. Si bien en los ovinos inoculados con la sangre de estos animales no se detectó expresión viral, en tres de ellos se registraron niveles de anticuerpos contra BVDV. Estos resultados indicarían que los animales de la condición II debieran ser objeto de mayores estudios para establecer la importancia de su rol en la epidemiología del BVDV.

Los animales de condición III no evidenciaron capacidad de transmisión viral en los cuatro ovinos inoculados en este ensayo; sin embargo, dado que en esta condición el virus también persiste en un número exiguo de células mononucleares al igual que en la condición II¹⁰, es posible que requieran dosis mayores de sangre para transmitir la infección, por lo cual es razonable recomendar que en un programa de control, estos animales deberían ser identificados y eliminados del rodeo.

Las condiciones III y IV, por lo tanto, representan formas de control inmunológico distintas y probablemente más efectivas, dado que no se detectaron evidencias de la presencia del virus en sangre periférica, ni respuesta serológica en los ovinos inoculados con la sangre de los animales de estas condiciones.

A manera de conclusión, se refirma la capacidad de transmisión horizontal interespecies, a partir de bovinos seropositivos portadores del virus, y se enfatiza la necesidad de profundizar los estudios relacionados con el rol de los bovinos seropositivos portadores de BVDV en la transmisión viral.

REFERENCIAS

1. **Boyun A.** 1968. Ficoll-hipaque method for separating mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21: 77-89.
2. **Carbrey E, Brown L, Chow T.** 1971. Recommended standard laboratory techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus diarrhoea and shipping fever (parainfluenza 3). *Proc US Anim Health Assoc* 75: 629-648.
3. **Carlsson U.** 1991. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec* 128: 145-147.
4. **Celedón M, Sandoval A, Droguett J, Calfio R, Ascencio L, Pizarro J, Navarro C.** 2001. Pesquisa de anticuerpos seroneutralizantes para pestivirus y herpesvirus en ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos de Chile. *Arch Med Vet* 33: 165-172.
5. **Dijkhuizen A, Huirne R, Jalvingh A.** 1995. Economic analysis of animal diseases and their control. *Prev Vet Med* 25: 135-149.
6. **Fray M, Paton D, Alenius S.** 2000. The effect of BVDV on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim Reprod Sci* 60: 615-627.
7. **Gogorza L, Morán P, Larghi J, Iglesias M, Perez A.** 2001. Vacunación contra la diarrea viral bovina: fortalezas y limitaciones. *Rev Taurus* 3: 4-15.
8. **Gogorza L.** 2002. Estudio de la respuesta inmune celular en bovinos seropositivos al virus de la diarrea viral bovina (BVDV). *Tesis Doctoral*, Fac. Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Prov. de Buenos Aires (Tandil, Argentina).
9. **Gogorza L, Morán P, Larghi J, Seguí R, Lissarrague C, Saracco M, Braun M, Esteban E.** 2005. Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in seropositive cattle. *Prev Vet Med* 72: 49-54.
10. **Gogorza L, Morán P, Larghi J, Braun M, Esteban E.** 2006. Detection of bovine viral diarrhoea virus by amplification on polycation-treated cells followed by enzyme immunoassay. *Rev Arg Micr* 38: 209-215.
11. **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.
12. **Houe H.** 1995. Epidemiology of BVDV. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 11: 521-547.
13. **Houe H.** 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection. *Vet Microbiol* 64: 89-107.
14. **Kelling C.** 1996. Planning bovine viral diarrhoea virus vaccination programs. *Vet Med* 91: 873-877.
15. **McGowan M, Kirkland P.** 1995. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Brit Vet J* 151: 263-270.
16. **Moennig V, Liess B.** 1995. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 11: 477-487.
17. **Reed L, Muench H.** 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27: 493-497.
18. **Van Campen H, Williams E.** 1996. Wildlife and bovine viral diarrhoea virus. *Proceeding International Symposium Bovine viral diarrhoea virus. A 50 Year Review*, Cornell (USA), p. 167-175.
19. **Weiland F, Weiland E, Unger G, Saalmuller A, Thiel H.** 1999. Localization of pestiviral envelope proteins Erns and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J Gen Virol* 80: 1157-1165.