

CULTIVOS CELULARES DE RIÑÓN FETAL BOVINO UTILIZADOS EN EL DIAGNOSTICO DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (DVB) EN COLOMBIA*

María Cristina Ramírez D.**

Víctor Vera A.**

Luis Carlos Villamil J.**

Gloria C. Ramírez N.**

Gustavo Arbeláez R.***

RESUMEN

Fueron trabajados trece cultivos primarios de riñón fetal bovino con el objeto de determinar la infectividad de estos órganos con el virus de la DVB. se utilizó para el crecimiento de las células suero fetal bovino inactivado con etilenimina binaria (BEI) con el fin de eliminar la posibilidad de infección de los cultivos con el virus de la DVB a partir del suero. El suero inactivado no fue tóxico para el crecimiento de las células. Doce de los cultivos estaban contaminados con el virus de la DVB y la mayor parte de ellos con cepas citopatógenicas. Se discuten las implicaciones de estos hallazgos y las alternativas para el diagnóstico de la enfermedad.

INTRODUCCION

La diarrea viral bovina (DVB) es una enfermedad infecto-contagiosa que cursa con diversidad de signos clínicos y afecta esencialmente el estado reproductivo de los bovinos. El virus posee un ácido nucleico RNA de polaridad positiva de 11 Kb de longitud y consta de un núcleo cápside rodeado de una envoltura lipídica (Purcio et.al.,1984). Perteneció a la familia flaviviridae, género pestivirus y se propaga por inhalación e ingestión de material contaminado por descargas nasales, oculares, saliva, orina o heces (Bown et. al.,1989). El virus de la DVB es sensible al eter y cloroformo y a desinfectantes como Clorhexidi-

na, aldehídos e hipocloritos (Bown et.al.,1989).

En Colombia la enfermedad fue diagnosticada por primera vez en el año de 1981 con una prevalencia serológica de 42.3% (Gallego et. al.,1987). En 1983 se presentaron una serie de abortos en el Departamento de Cundinamarca producidos por un virus NCP de DVB. Las pruebas serológicas mostraron un 100% de positividad de los animales con títulos de anticuerpos que fluctuaron entre 1:32 a 1:2048. No fue posible el aislamiento del virus (Gallego et. al.,1987).

Las infecciones prenatal y postnatal y el desarrollo clínico de la enfermedad dentro de un hato dependen de la cepa, la edad de los animales, el estado inmune y diversos factores de manejo (Baker et. al.,1987).

La infección persistente se establece cuando el feto es expuesto al virus de la DVB entre los 90 y 120 días de gestación. Los animales no presentan anticuerpos seroneutralizantes y son inmunotolerantes al virus homólogo (Kelling et. al.,1990).

Una de las grandes dificultades que se presentan para el diagnóstico de la enfermedad es el alto porcentaje de cultivos contaminados con el virus de la DVB como consecuencia de la infección intrauterina de los donantes (Bown et. al.,1989).

Las líneas celulares y los cultivos primarios pueden contaminarse con el virus cuando son suplementados con el suero fetal bovino

contaminado. La rata de contaminación en la producción de suero fetal bovino comercial tiene un rango de 10-75% (Ruth).

La prevención de la infección prenatal con el virus de la DVB es esencial para un correcto control de la enfermedad y para evitar pérdidas reproductivas y el nacimiento de terneros con infección persistente. Los bovinos con infección persistente son portadores del virus, constituyéndose en una fuente primaria de infección en un hato, siendo indispensable su eliminación para el control de la infección (Barlow et. al., 1986; Groteiueshen, 1988).

Desde hace aproximadamente 4 años no se realiza el diagnóstico de la DVB en el Instituto Colombiano Agropecuario ICA debido a la frecuente contaminación de los riñones de bovinos de los mataderos y por consiguiente de los cultivos primarios con el virus de la DVB. De esta manera no es posible aislar el virus de muestras para diagnóstico ni se puede realizar la técnica de microneutralización para la determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes.

El propósito de este trabajo es el de evaluar cultivos primarios de riñón fetal bovino con el fin de determinar la infectividad con el virus de la DVB, replicando las células con suero fetal bovino inactivado con etilenimina binaria (BEI) para eliminar la posible fuente de infección con el virus a través del suero.

MATERIALES Y METODOS

Inactivación del suero

El suero fetal bovino utilizado para la producción de los cultivos primarios de riñón fetal bovino (RFB) fue sometido a inactivación con etilenimina binaria (BEI) a una concentración de 3 mm al 3%. Se conservó a una temperatura de 26°C durante 24 horas y con agitación continua, tiempo este considerado óptimo para la inactivación del virus que pudiera estar presente en el suero. Transcurrido el tiempo previsto, se adicionó tiosulfato de sodio 1m al 1% para neutralizar los residuos del BEI (Abaracon y col.,1979; Bahneman et. al.,1975).

Pruebas de Toxicidad

El suero inactivado fue previamente ensayado en cultivos de la línea celular BHK21 cl13, los cuales crecieron normalmente sin mostrar rasgos de toxicidad, comparándolo con suero sin inactivar.

Fetos

Los trece fetos utilizados para la preparación de los cultivos primarios de RFB fueron colectados de los mataderos de San Martín y Guadalupe de la ciudad de Bogotá en un período de 4 meses, la edad de los fetos oscilaba entre 4 y 7 meses y fueron colectados con la respectiva placenta inmediatamente después del sacrificio de las madres. El transporte de los mismos al laboratorio se realizó en recipientes

* Esta investigación se realizó en el Postgrado de Salud y Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia con el apoyo financiero de la Corporación Andina de Fomento CAF Proyecto: "Desarrollo, normalización y aplicación de Kits diagnósticos para el virus de la Diarrea Viral Bovina".

** Respectivamente: DMV., MSc., DMV., MSc., DMV.Ph.D., DMV., MSc., Profesores Asociados, Universidad Nacional de Colombia.

*** DMV., Ph.D., Investigador Asociado ICA-CEISA, Ciudad Universitaria.

tes plásticos estériles y herméticamente cerrados.

Obtención de los riñones

Los fetos fueron lavados con agua corriente y secados con gasa estéril. Se colocaron en bandejas metálicas previamente desinfectadas con alcohol, flameadas e introducidas a la cabina de flujo laminar. Los fetos fueron desinfectados con alcohol y flameados antes de proceder a la extracción de los riñones. Trabajando en cabina de flujo laminar se realizó una incisión a través de los ijares derecho e izquierdo con tijeras estériles. El corte comprendió piel, músculo y peritoneo hasta la exposición total de los riñones, desprendiendo cuidadosamente la fascia renal para evitar el contacto con líquidos abdominales. Se tomaron los órganos y se depositaron en cajas de petri estériles y se trasladaron a otra cabina de flujo laminar vertical.

Preparación de los cultivos

Trabajando en condiciones de esterilidad se desprendió cuidadosamente el tejido adiposo y la cápsula renal hasta dejar expuesta la corteza. Se realizaron cortes de la corteza en pequeñas porciones, las cuales fueron maceradas y lavadas 3 veces en frascos de tripsinización con solución bufferada de fosfatos (PBS) pH 7.2. Terminado el último lavado se utilizó PBS con tripsina concentrada al 2.5% y se dejó en tripsinización por 1½ horas a 37°C. Se adicionaron 7 ml de SFB inactivado con BEI para neutralizar el efecto de la tripsina. Se filtró por filtro de gasa la suspensión celular, se centrifugó a 9000gr. por 15 minutos y se resuspendió en medio Hank's con SFB al 10% inactivado, antibióticos (Penicilina-estreptomina)

cina) y anfotericina, a una concentración aproximada de 3×10^6 céls/ml.

Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Los cultivos primarios de riñón fetal bovino fueron controlados por la técnica de IFI para descartar la infección con el virus de la DVB (Morilla y col., 1986).

En la técnica se utilizó cultivos primarios de riñón fetal bovino crecidos en laminillas, antisuero de referencia y conjugado preparado por el posgrado de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia. Este consistió de antigamaglobulina bovina conjugada con fluoresceína. Como controles negativos se utilizó cultivos primarios de embrión de pollo crecidos en laminilla con suero fetal bovino inactivado y como controles positivos células de la línea MDBK infectadas con el virus de la DVB y utilizada en las pruebas de rutina en el ICA CEISA.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los trece cultivos primarios de riñón fetal bovino trabajados en el laboratorio, solamente uno de ellos mostró la morfología normal in vitro, completándose la monocapa celular a las 96 horas de incubación. Este cultivo resultó negativo a la presencia del virus de la DVB, mediante la técnica de IFI en tres pasajes consecutivos. Los restantes cultivos fueron positivos por esta técnica, presentando un efecto citopático marcado compatible con una contaminación con virus adventicios, impidiendo la formación de una monocapa normal y por consiguiente la replicación de los

cultivos para un segundo y tercer pasaje (Tabla No. 1).

Los resultados del presente trabajo muestran un porcentaje muy alto (92.4%) de cultivos primarios de riñón fetal bovino contaminados con el virus de la DVB, lo cual constituye un serio obstáculo para el diagnóstico y aislamiento del virus en nuestro medio. Schell et. al. en 1972 y Hasan et. al. en 1986 reportan porcentajes de contaminación de estos cultivos con el virus de la DVB en el orden del 30 y 42% respectivamente indicando que el problema tiende a difundirse, lo cual concuerda con los hallazgos de esta investigación. Dichos resultados ponen de manifiesto un serio problema para el diagnóstico y aislamiento de los virus de DVB, rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y parainfluenza (PI3) para los cuales también se utilizan estos cultivos. A pesar de que las publicaciones sobre contaminación de cultivos primarios con virus de DVB hablan hasta ahora de cepas no citopáticas (Bolin et. al., 1991; Ferneliuss, 1964), las cuales eran detectadas por la técnica de IFI, en el presente trabajo, la contaminación encontrada provenía de cepas citopáticas, ya que el efecto patógeno de las mismas fue muy evidente. Estos cultivos no permiten el crecimiento de cepas de campo, posiblemente porque las cepas contaminantes, compiten por los receptores dentro de las células, o quizá porque al estar contaminadas las células con una cepa de VDVB, el interferón le impide la entrada a una nueva cepa, como es el caso del virus de referencia utilizado en las pruebas de micro neutralización para la determinación de niveles de anticuerpos (Shirai et. al., 1984). Por otra parte, el incremento en la contaminación de los riñones con cepas citopáticas puede deberse a la alta

concentración de virus a nivel de campo, lo cual puede corresponder a vacunaciones masivas con vacunas a virus vivo y mezcladas con IBR y PI3, reportadas por el centro de diagnóstico del ICA en Bogotá (1992). No obstante lo anterior, es necesario tener en cuenta que en esta investigación, las muestras fueron tomadas en dos mataderos de Bogotá, lo cual circunscribe los resultados a las regiones que suministran animales a dichos mataderos. Por lo tanto es conveniente realizar un estudio mas detallado, principalmente en regiones catalogadas como de extracción de ganado, para tratar de localizar regiones libres o que presenten baja incidencia para el virus de DVB, con el fin de obtener una fuente de animales libres de dicho virus.

Otra alternativa a este problema, además de localizar regiones libres de la enfermedad, es el de encontrar una línea celular sensible al virus y libre de este agente y trabajar siempre con suero fetal bovino inactivado con BEI. Podrá pensarse también en estandarizar la técnica de ensayo inmunoenzimática (ELISA), la cual tiene la ventaja de no requerir cultivos celulares para su funcionamiento, resultando mas económica y de más rápida ejecución, pudiendo ser utilizada en la detección del virus y en la determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes.

Muchos productos biológicos, particularmente de origen bovino, los cuales pueden contener el virus de la DVB, son ampliamente utilizados en los medios de cultivo (Hasan et. al., 1986), por esta razón se utilizó suero fetal bovino inactivado con BEI para eliminar la posibilidad de infección de los cultivos primarios de RFB a partir del suero.

TABLA 1
CONTAMINACION DE CULTIVOS PRIMARIOS DE RIÑÓN FETAL BOVINO
CON VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA

| | SUERO INACTIVADO | SUERO NO INACTIVADO |
|-----------------------|---------------------|------------------------|
| Total de cultivos | 13 | 13 |
| Cultivos contaminados | 12 | 12 |
| Cultivos libres | 1 | 1 |
| % contaminados | 92.4 | 92.4 |

BIBLIOGRAFIA

1. ABARACON, D.; GIACOMETTI, H.; MESQUITA, J. A. El uso de la etilenimina binaria (BEI) como inactivante del virus de la fiebre aftosa producido por diferentes técnicas semiindustriales. Bol. Cent. Panam. fiebre aftosa. 33-34: 1-5, 1979.
2. BAHNEMAN, H. G.; Binary Ethylenimine as an inactivant for foot-and mouth disease viruses and its application for vaccine production. Arch. virol. 47: 47-56, 1975.
3. BAKER, J. C. Bovine viral diarrhea virus: A review. Javma 190: 1449-1458, 1987.
4. BARLOW, R. M.; NATTLINGTON, P. F.; GARDINER, A. C.; GREIG, A.; CAMPBELL, J. R. Persistent bovine virus diarrhea virus infection in A bull. The Veterinary record. 22: 321-324, 1986.
5. BOLIN, S. R.; PETER, J.; MATTHEWS, J. RIDPATH, F. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhea virus and antibodies against bovine diarrhea virus. J. Vet. diagn. invest. 3: 199-203, 1991.
6. BOWN, K. H.; PERRY, B.D.; CESSARD, P.; DUBOWIET, J.; HUNTER, W. S.; HOOKE, R. L. Epidemiology of bovine viral diarrhea-mucosa disease in beef cattle. Continuing education article No. 10 vol. 11; 1147-1156, 1989.
7. FERNELIUS, A. L. Non cytopathogenic bovine viral diarrhea virus detected and titrated by immunofluorescence. Canada J. comp. Med. Vet. Scie. 28: 121-126, 1964.
8. GALLEGU, I.; CORTES, E.; DE GALVIS, A. L.; DE AGUDELO, D. L. Diarrea viral bovina en Colombia. Revista Analac. 70, 10-13, 1987.
9. GROTELUESHEN, D. M. Persistent infections and immunological aspects of BVD virus in beef cattle. The bovine practitioner. 23: 52-55, 1988.
10. HASSAN, A. K. M.; SCOTT, G. R. A technique to obviate the risk of inadvertent infection of cell cultures with bovine viral diarrhea virus. J. Comp. Path. 96: 241-246, 1986.
11. KELLING, C. L.; STINE, L. E.; RUNPS, K. K.; PARKER, R. E.; KENNEDY, J. E.; STONE, R.T.; ROSS, G. S. Investigation of bovine viral diarrhea virus infection in a range beef cattle herd. Javma 197: 587-593, 1990.
12. MORILLA, A.; BAUTISTA, C. Manual de Inmunología, 1a.ed. Edit Diana. 1986, p. 433.
13. PURCIO, A. F.; LARSON, R.; COLLET, M. S. Characterization of bovine viral diarrhea virus proteins. Journal of virology 50, 666-669, 1984.
14. RUTH, G. R. Bovine viral diarrhea. A difficult infection to diagnostic Veterinary.
15. SCHELL, K.; SANDERSON, R. P.; WHALEN, J. W.; BITTLE, J.L. The antigenicity multivalent vaccines for bovine respiratory disease. Cornell Veterinary. 62: 101-109, 1972.
16. SHIRAI, J. TAMAKA, Y.; HORIUCHI, T. Interference patterns between strains of bovine viral diarrhea mucosal disease virus. J. vet. sci. 46: 901-904, 1984.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA PROGRAMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAGISTER EN SALUD Y PRODUCCION ANIMAL

LINEAS DE INVESTIGACION

FISIOLOGIA
NUTRICION ANIMAL
GENETICA Y MEJORAMIENTO ANIMAL
MICROBIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA
FISIOPATOLOGIA

INFORMES

☎ 268 0506
Santafé de Bogotá, D.C.