EVIDENCIA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN EL OVIDUCTO DE VACAS DESCARTADAS POR INFERTILIDAD

Liliana Chacón J., MV.; Héctor E.González CH., MVZ. MSc.;
*Alba Lucía Hernández, Bact., MSc.**

INTRODUCCION

Inicialmente, la Diarrea Viral Bovina (D.V.B.) se describió como una entidad de alta morbilidad y alta mortalidad del tubo digestivo de los rumiantes domésticos y silvestres (Barker y Vandremel, 1985). Sin embargo, posteriormente se demostró que además de su tropismo por las estructuras linfoides y el tracto gastrointestinal, el virus es capaz de desencadenar síndromes reproductivos que quizás tienen repercusiones sanitarias y económicas más importantes que las causadas por la enfermedad de las mucosas; estos síndromes incluyen infertilidad, mortalidad embrionaria, aborto y efectos teratogénicos entre otros (Archbald, 1981; Barker y Vandremel, 1985). Por tanto, probablemente los efectos negativos de mayor repercusión de la enfermedad desde el punto de vista sanitario y económico para el ganado bovino son aquéllos relacionados con las fallas en la reproducción y la capacidad inmunodepresora del virus, efectos que han sido demostrados ampliamente por muchos investigadores (Bolin *et al.*, 1985; Jubb *et al.*, 1985; Potgieter *et al.*, 1984).

La infertilidad temporal o definitiva en las vacas de leche, como bien es sabido, tiene numerosos orígenes, unas veces unifactorial, otras multifactorial, que si son bien conocidos, pueden ser manejados y controlados adecuadamente mediante metodologías diagnósticas y terapéuticas de rutina; sin embargo, existe un porcentaje relativamente alto de vacas infértiles que no presentan evidencias clínicas de endometritis, ciclan normalmente pero son repetidoras a pesar de ser inseminadas con semen de calidad comprobada.

* Universidad de Ciencias Agropecuarias- UDCA, Santafé de Bogotá, D.C.; Programa Nacional de Salud Animal-CORPOICA Programa Nacional de Salud Animal-CORPOICA, Av. Eldorado No. 42-42 Santafé de Bogotá, D.C., A.A. 29743.

Estudios previos en este tipo de animales infértiles han demostrado hasta en un 77% la presencia de endometritis subclínicas solamente detectables por evaluación microscópica de muestras del endometrio tomadas mediante biopsia endometrial (González *et al.*, 1985; Rodríguez *et al.*, 1991). Los aislamientos bacteriológicos demostraron aunque en forma variable la presencia de *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp y *Actinomyces pyogenes;* en el 23% restante no hubo aislamientos y los endometrios no mostraron ningún tipo de reacción anómala (Rodríguez *et al.*, 1991). Por tanto, es de suponer que agentes de tipo viral podrían estar alterando el microambiente del tracto reproductivo femenino (oviducto y/o endometrio), ocasionando infertilidad o mortalidad embrionaria temprana.

La falla en la fertilización y el desarrollo anormal del embrión son las principales manifestaciones de los efectos adversos observados en la infección con el virus de la D.V.B. en el tracto reproductivo (Grahn *et al.*, 1984). La infección aguda puede traer como consecuencia la inflamación del folículo que conllevaría a una degeneración del oocito (16). Además, se han observado diferentes grados de salpingitis y endometritis caracterizadas por una infiltración difusa o focal con células mononucleares particularmente linfocitos y células plasmáticas; además se ha establecido que los anticuerpos neutralizantes parecen no proteger a nivel local el tracto genital tubular ni los ovarios (2).

Los objetivos del presente estudio pretenden profundizar en el conocimiento de la infertilidad en hembras bovinas a través de estudios morfológicos e inmunoquímicos en vacas que a pesar de su infertilidad, poseen tractos reproductivos clínicamente normales.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras (n=40) fueron tomadas de vacas *Bos Indicus,* vacías, clínicamente normales y sacrificadas en el matadero San Martin en la jornada normal de sacrificio durante un período de tres meses. El tiempo que transcurrió desde el sacrificio hasta la toma de las muestras fue aproximadamente de cinco minutos. Se tomó el tracto reproductivo en su totalidad, incluyendo vagina, cervix, útero, oviductos y ovarios. Estas muestras fueron conservadas y transportadas en refrigeración depositadas en bolsas plásticas estériles. De cada animal, previamente identificado, se tomó una muestra de sangre sin anticoagulante por medio de punción ventricular; las muestras de sangre fueron igualmente transportadas refrigeradas al laboratorio, en donde se separó el suero que fue conservado en congelación hasta su procesamiento.

Los tractos reproductivos se evaluaron macroscópicamente en la sala de necropsias del C.E.I.S.A. por medio del siguiente protocolo:

a) Observación externa del tracto reproductivo describiendo y consignando las características anatómicas de cada una de las porciones del tracto reproductivo.

b) Mediante disección longitudinal desde el cervix hasta el cuerpo uterino y posteriormente cada uno de los cuernos se expuso la mucosa endometrial y se describieron las características morfológicas.

c) Los oviductos se evaluaron por sus características externas y en los ovarios, además de describir las características externas se evaluó el parénquima realizando un corte longitudinal. Las evaluaciones se consignaron en forma descriptiva.

Se tomaron muestras de ovarios, oviductos y cuerno uterino, que se fijaron en formalina neutra al 10%, procesadas por el método de inclusión en parafina, y se procesaron para estudios morfológicos con microscopía de luz e histoquímicos por el método de inmunoperoxidasa (I.P.), empleando un suero policlonal anti D.V.B. y un conjugado de Anti IgG bovina unida a peroxidasa. En el presente artículo se reportan los resultados obtenidos en los oviductos; las muestras de ovario y endometrio serán objeto de estudios posteriores.

RESULTADOS

En 35 (87.5 %) casos los oviductos eran simétricos, de curso tortuoso, sostenidos en el mesosalpinx y exhibían una adecuada vasculatura, el diámetro se observó que disminuía gradualmente del extremo proximal al distal, la coloración en todos los casos presentó una apariencia blanco amarillenta. Solamente en cinco (12.5 %) casos se detectaron alteraciones macroscópicas, particularmente asimetría unilateral dada por el aumento marcado en el diámetro de una de las dos estructuras y en uno que aunque tenía las características morfológicas, presentó en su serosa pequeños focos hemorrágicos de naturaleza petequial.

Microscópicamente las reacciones inflamatoria y degenerativa fueron los cambios anómalos que se encontraron en 18 (45 %) de los 40 casos evaluados. La reacción inflamatoria, localizada en la lámina propia, consistió esencialmente en una infiltración difusa o focal perivascular de una población mixta de linfocitos, células plamáticas y macrófagos (Figuras 1 y 2). La reacción inflamatoria anteriormente descrita fue más severa en aquellos oviductos que macroscópicamente habían presentado asimetría. Los cambios observados en las capas muscular y adventicia fueron esencialmente de tipo inflamatorio con características similares a las descritas para la lámina propia.

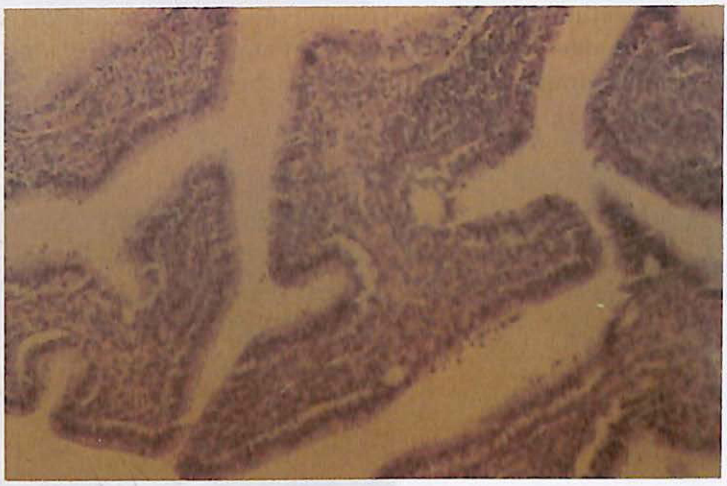

FIGURA 1. Oviducto. Infiltración mononuclear en la lámina propia (A). Obsérvese la integridad del epitelio de revestimiento (B). H-e. 1200 X.

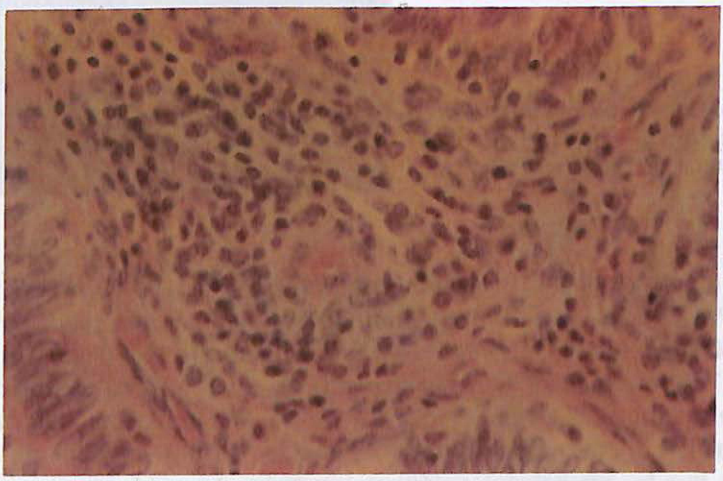

FIGURA 2. Oviducto. Infiltración, perivascular de mononucleares en la lámina propia. Obsérvese la presencia de linfocitos (A), macrófagos (B). H-e. 1200 X.

Los cambios degenerativos se encontraron estrictamente localizados en el epitelio de revestimiento y consistieron en la presencia de vacuolas citoplasmáticas de diferente tamaño y que en algunas oportunidades la fusión de varias vacuolas formaban estructuras que daban la apariencia de degeneración quística (Figura 3).

FIGURA 3.
Oviducto. Degeneración vacuolar del epitelio de revestimiento. Presencia de estructuras quísticas epiteliales (A). H-e. 300 X.

De los 40 oviductos evaluados con la técnica de I.P., 19 que representan el 47.5 %, se caracterizaron por presentar una granulación pardo amarillenta de localización intracitoplasmática y con un contraste gris (Figura 4). Las restantes 21 muestras (52.5 %) evaluadas no presentaron dicha granulación y solamente exhibían una tonalidad grisácea en su citoplasma (Figura 5). Los oviductos del primer grupo fueron considerados positivos al virus de la D.V.B., mientras que los enunciados en última instancia se consideraron negativos.

La confiabilidad del procedimiento e interpretación se basan en las reacciones que se observaron en cada uno de los controles tomados como positivos, en los controles tomados como negativos y en los tejidos a los cuales se les realizó el control de la prueba como tal.

FIGURA 4.
Oviducto. Nótese la coloración pardo amarillenta intracitoplasmática en el epitelio de revestimiento. Inmunoperoxidasa positiva para antígeno de D.V.B. 3000 X.

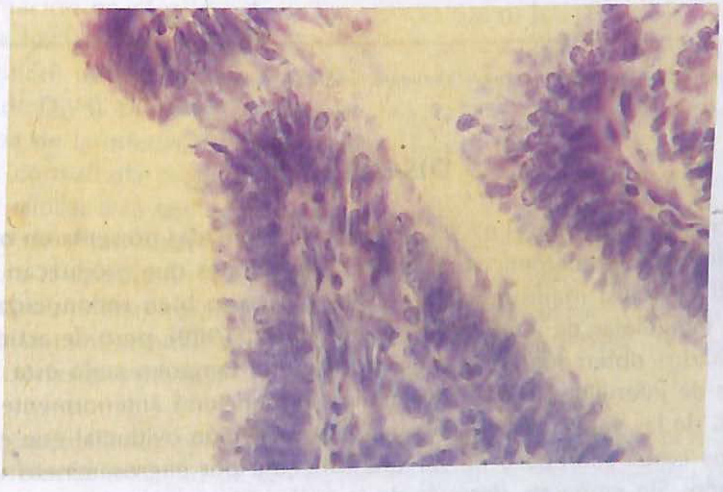

FIGURA 5. Oviducto. Reacción inmunoperoxidasa negativa para el antígeno de D.V.B. Nótese la ausencia de coloración pardo amarillenta en el citoplasma del epitelio. 1200 X.

Se realizó la prueba de Chi cuadrado para observar dependencia entre la I.P. y los hallazgos microscópicos, explorando la posibilidad de correlacionar la presencia o ausencia de las lesiones detectadas con positividad o negatividad para la prueba de I.P., considerándose todas las posibles vías de dependencia. En primera instancia no se encontró una dependencia estadística entre las lesiones inflamatorias o degenerativas en el oviducto y la positividad o negatividad a I.P. (P>0.05). Tampoco se halló ningún grado de dependencia cuando se evaluaron por separado (Tabla 1.)

TABLA 1. Frecuencias y porcentajes de los distintos tipos de reacción en el oviducto y su dependencia con la reacción de I.P. para D.V.B.. Resumen del análisis del Chi cuadrado*.

Oviducto		I. P. negativo		I.P. positivo	
		#	%	#	%
Inflamación	No	11	27.5	11	27.5
	Si	10	25	8	20
Degeneración	No	19	47.5	18	45
	Si	2	5	1	2.5
Necrosis	No	21	52.5	19	47.5
	Si	0	0	0	0

No se encontró dependencia estadística entre las variables (P>0.05 %).

DISCUSION

Macroscópicamente, el 87.5% de las vacas evaluadas presentaron oviductos con características anatómicas normales. Alteraciones que produzcan obstrucción, adherencias, malformación del oviducto son bien reconocidas como causales inmediatas de infertilidad bovina (Hafez, 1989), pero de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, tampoco sería ésta la causa aparente de infertilidad puesto que como se mencionó anteriormente sólo en el 12.5% de las vacas evaluadas se encontró afección oviductal que en ninguno de los casos sobrepasó de ser una asimetría por engrosamineto unilateral del órgano. Sin embargo, después de la evaluación microscópica de estos órganos el concepto de normalidad varió considerablemente ya que sólo el 55 % de los oviductos tenían características histológicas normales y en el 45 %

restante se comprobó la presencia de reacciones inflamatorias y/o degenerativas (Tabla 1) que consistieron en infiltración mononuclear en la lámina propia y degeneración vacuolar en el epitelio de revestimiento.

Varios autores establecieron previamente en forma experimental el tipo y naturaleza de reacción que pueden desencadenar algunos microorganismos como el virus de la D.V.B. (Archbald, 1981) y el de R.I.B. (Kendrick y McEntee, 1965) o *Chlamydia trachomatis* (Johnson y Taylor, 1982) y *el Mycoplasma* spp. (Hirt *et al.*, 1966), entre otros agentes biológicos. Las lesiones descritas por los autores mencionados coinciden con las encontradas en el presente estudio. Si se considera que el concepto anterior fue el resultado de experimentación controlada en donde los autores citados inocularon en forma independiente los patógenos en referencia, es probable que alguno de ellos, particularmente los de naturaleza viral, sean los responsables de la reacción descrita en el presente estudio.

El oviducto desde el punto de vista funcional representa un área anatómica importante en el proceso de transporte de gametos, fertilización, transporte de la mórula y el blastocisto a los cuernos uterinos; el éxito de este proceso está mediado en parte por un microambiente adecuado, microambiente que necesariamente se altera en presencia de reacciones de tipo degenerativo e inflamatorio como las observadas en los oviductos evaluados, sería el factor endógeno responsable, al menos en parte, de la disfunción reproductiva, concepto que coincide con el expresado por Archbald en 1981, quien aduce que la inflamación en el oviducto podría afectar negativamente la progresión del esperma hacia el oocito, o el desarrollo de las primeras divisiones de clivaje del embrión; de esta forma las afecciones del tracto genital ocasionadas por el virus de D.V.B. podrían explicar el síndrome de la vaca repetidora como consecuencia de la infertilidad o de la mortalidad embrionaria temprana. En la literatura consultada ninguno de los autores mencionan una degeneración vacuolar similar a la que se reporta en el presente estudio. Es posible que la presencia de estas vacuolas intracitoplasmáticas sea el efecto de partículas virales sobre el epitelio de revestimiento, tal como sucede en la respuesta epitelial de las superficies epidérmicas cuando son invadidas por virus del género Pox (11); la confirmación o negación de este concepto debe ser motivo de investigaciones posteriores.

Un porcentaje alto (47.5 %) de los oviductos analizados por la prueba de I.P. para detectar antígeno de D.V.B. fueron positivos; este resultado pone de manifiesto la importancia que tiene este virus en la patogénesis de las enfermedades que afectan el tracto reproductor femenino y que necesariamente deben repercutir negativamente en la eficiencia reproductiva. El resultado obte-

nido con esta prueba desde el punto de vista tecnológico se considera de confiabilidad por cuanto los controles positivos y negativos en cada uno de los casos se comportaron como tales.

El análisis estadístico (X^2), en donde se evaluó el grado de dependencia entre peroxidasa positivo y la presencia o ausencia de lesiones oviductales, demostró que no existe tal dependencia ($P>0.05$). Este análisis se realizó enfrentando todos los hallazgos posibles en forma individual y sumatoria con respecto a la morfología descrita. En términos estadísticos este análisis significa que con una probabilidad mayor de 95% la presencia de antígeno de D.V.B. detectada por I.P. en el oviducto no necesariamente está relacionada con lesiones; ni que toda reacción inflamatoria o la ausencia de ella dependa de la presencia de antígenos de D.V.B. en el oviducto detectada por I.P.

La primera impresión de este resultado en términos experimentales sería desalentadora en cuanto a los objetivos propuestos al plantear el presente estudio; sin embargo, se considera que el resultado motiva la necesidad de continuar con los estudios morfométricos e inmunoquímicos que expliquen la participación del virus de D.V.B. y de otros agentes como el virus de R.I.B., *Mycoplasma sp.* y *Chlamydia sp.* Al evaluar el resultado en cuanto a reacción inflamatoria del oviducto contra reacción I.P. positiva, se determinó que en ocho de los 18 oviductos que presentaron oviductitis no supurativa fue posible detectar la presencia del antígeno del virus de D.V.B., probablemente los diez casos que en presencia de inflamación fueron negativos para el virus en mención, otros agentes sean los responsables de ella, situación que será motivo de una próxima investigación con el virus de R.I.B. Un poco más difícil resulta discutir aquellos casos en donde no se encontraron reacciones inflamatorias, ni degenerativas, ni necróticas en el oviducto, pero que marcaron positivamente por I.P. a la presencia de antígeno de D.V.B. Sinembargo, este hecho podría tener explicación si se considera que la evaluación morfológica e inmunoquímica de los oviductos se limitó por razones de costos a una pequeña porción de este órgano y por tanto, se recomienda que en estudios posteriores esta evaluación se lleve a cabo al menos en tres áreas diferentes del oviducto como son una porción infundibular, ítsmica e intramural; otra posibilidad que explicaría este hallazgo es que el virus, aunque presente en el oviducto no esté produciendo una reacción adversa en virtud de la naturaleza del virus o por el estado inmunotolerante de los animales.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La evaluación microscópica del tracto reproductivo permitió demostrar que existen reacciones de tipo inflamatorio, degenerativo y necrótico que no pue-

den ser detectadas clínicamente y que en un momento dado serían las causantes de desórdenes reproductivos como infertilidad y mortalidad embrionaria temprana, reacciones que son en general desencadenadas por agentes virales como el de la D.V.B. y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB); por lo tanto, se recomienda que los estudios virológicos relacionados con infertilidad incluyan la investigación de estos agentes en los ovarios, oviductos y endometrios.

Las pruebas inmunoquímicas demostraron la presencia de antígeno de D.V.B. en los oviductos, con y sin reacción inflamatoria; estudios posteriores deberán incluir la realización de la técnica en diferentes porciones del mismo órgano y en otros tejidos como endometrio y ovario de los tractos reproductivos infértiles.

La presencia en el presente estudio de reacciones inflamatorias en el oviducto pero negativas a inmunoperoxidasa sugieren que otros agentes de naturaleza viral podrían ser los causantes de esta reacción; por tanto, se recomienda que se emplee la misma técnica explorando la posibilidad de detectar el virus de RIB.

Sería conveniente que entre el estudio de las causas de infertilidad se incluyera la evaluación de agentes no virales tales como *Mycoplasma* spp. y *Chlamydia trachomatis.*

Dados los inconvenientes que actualmente tiene la prueba de seroneutralización para trabajos de investigación y diagnóstico en D.V.B., se recomienda el uso de técnicas alternativas como la inmunoperoxidasa en la detección de anticuerpos o de antígenos de D.V.B., prueba que ofrece un alto grado de confiabilidad y especificidad.

Dadas las reacciones adversas ocasionadas por el virus de D.V.B. descritas en el presente estudio y reportadas en la literatura, es motivo de reflexión considerar el establecimiento ordenado y regular de medidas preventivas incluyendo esquemas de vacunación apropiados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Archbald, L.F. 1974. Isolation of the virus of bovine virus diarrhea from the uterocervical secretions of a «repeat-breeder» cow. Vet. Med. Small. Anim. Clin. ***69***: 1540-1541.

2. Archbald, L.F.1981. Role of the virus viral diarrhea (BVD) in infertility in the cow. Procedings of the Soc. Theriog. ann Meeting. Sep: 23-25.

3. Barker, I.K.; Vandreumel, A.A. 1985. The alimentary system in: Pathology of domestic animals. Vol. 2 Third Edition. ed Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C. and PaLmer, N. Academic. Toronto. 582p.

4. Bolin, S.R.; McClurklin, A.W. and Coria, M.F. 1985. Effects of bovine viral diarrhea virus on percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle. Am. J. Vet. Res. ***46***: 884-886.

5. Dufell, S.J.; Sharp, M.W. and Winkler, C.E. 1984. Bovine virus diarrhea mucosal disease virus-induced fetopathy in cattle: efficacy of prophylactic maternal preexposure. Vet. Rec. ***114***: 558-561.

6. González, H.E.; Crowell, W.A.; Candle, A.B.; Thompson, F.N. 1985. Morphometric studies of the bovine uterus: Microscopic lesions and retrospective reproductive history. Am. J. Vet. Res. ***46***: 2588-2595.

7. Grahn, T.C.; Fahning, M.L. and Zemjanis, R. 1984. Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhea virus. J.A.V.M.A. ***185***: 429-432.

8. Hafez, E.S.E. 1989. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5a ed. México. Interamericana. McGraw-Hill. 644p.

9. Hirt, R.S.; Plastridge, W.N.; Tourtellotte, M.E. and Nielsen, S.W. 1966. Genital mycoplasmosis in cattle and man. J.A.V.M.A. ***148*** (3): 277-282.

10. Johnson, A.P. and Taylor -Robinson, D. 1982. Experimental infection of the primate genital tract with *Chlamydia trachomatis*. Am J. Path. ***106*** (1):132-135.

11. Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C. and Palmer, N. 1985. Pathology of domestic animals. 3rd ed. 2. New York. Academic. pp. 95-100.

12. Kendrick, J. and McEntee, K. 1965. The effect of artificial insemination with semen contaminated with IBR-IPV virus. Part of a thesis presented to the Faculty of the Graduate School of Cornell University. Ithaca, New York.

13. Potgieter, L.N.D.; McCraken, M.D.; Hopkins, F.M, Walker, R. D. and Guy, S. 1984. Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine virus diarrhea virus. Am. J. Vet. Res. ***45***: 1582-1585.

14. Potgieter, L.N.D.; McCraken, M.D.; Hopkins, F.M, and Walker, R. D. 1985. Comparison of pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhea virus. Am. J. Vet. Res. ***46***: 151-153.

15. Rodríguez, I.; González, H.E. y Gallego, M.I. 1991. Correlación de la morfología endometrial con aislamientos bacteriológicos en vacas infertiles de la Sabana de Bogotá. Revista ICA. ***26***: 275- 286.

16. Setongo, Y. K.; Johnson, R.H. and Smith, J.R. 198. Association of Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease virus with ovaritis in cattle. Aust. Vet. J. ***56***: 272-273.