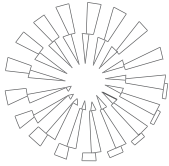


## Presencia del virus de la diarrea viral bovina y su asociación con otros cuadros patológicos en ganado en corral de engorda

## Presence of bovine virus diarrhea in association with other pathologies in feedlot cattle



Rafael Ramírez Romero\* Bernabé Chavarría Martínez\*\* Alfonso López Mayagoitia\*\*\*  
Luis Edgar Rodríguez Tovar\* Alicia Magdalena Nevárez Garza\*

### Abstract

Bovine feedlots are intensive production systems of significant importance in Mexico. The present study describes the presence of bovine virus diarrhea (BVD) causing subacute to chronic lesions in feedlot cattle, associated with other pathologies. Animals included in this study were discarded after they received therapy several times due to chronic pneumonia, or anaplasmosis. Bovine virus diarrhea antigen was identified by immunohistochemistry in small intestine and myocardium in six cases of chronic suppurative bronchopneumonia with extensive areas of caseous necrotic bronchiectasis, previously diagnosed as *Mycoplasma bovis* pneumonias (retrospective group, n = 6). Furthermore, based on characteristic histopathologic lesions other nine cases were included (prospective group, n = 9). Bovine virus diarrhea antigen was recognized in two animals with pneumonic lesions, including a case with fibrinous bronchopneumonia as well as suggestive lesions of infectious bovine rhinotracheitis (1/9), and another one with suppurative bronchopneumonia and myocarditis suggestive of *Histophilus somni* (1/9). In addition, one positive case was associated to anaplasmosis (1/9). Other two positive cases showed a conspicuous fibrinous peritonitis (2/9). The rest of the animals in this group resulted negative (4/9). Histopathological characteristics of the lesions and their association with the antigen in situ confirm the presence of BVD. This presentation is compatible with the acute infection syndrome. This is the first report of BVD infection and concomitant pathologies in feedlot cattle in Mexico.

**Key words:** BOVINE VIRUS DIARRHEA, ACUTE INFECTION, FEEDLOT CATTLE, IMMUNOHISTOCHEMISTRY.

### Resumen

El ganado en corral de engorda es un sistema de producción intensivo de gran importancia en México. En este trabajo se describe la infección por diarrea viral bovina (DVB), ocasionado por lesiones subagudas y crónicas en bovinos en corral de engorda, y su asociación con otras patologías. Los animales de este estudio fueron considerados de rechazo después de ser tratados en diferentes ocasiones por enfermedad respiratoria, o bien anaplasmosis. El antígeno de DVB fue identificado por inmunohistoquímica (IHQ) en intestino delgado y miocardio en seis casos de bronconeumonía supurativa crónica con extensas áreas de bronquiectasia con necrosis caseosa, los cuales habían sido previamente diagnosticados como neumonías por *Mycoplasma bovis* (grupo retrospectivo, n = 6). Además, se incluyeron otros nueve casos con base en las características histopatológicas de las lesiones (grupo prospectivo, n = 9). El antígeno de DVB se reconoció en dos animales con lesiones neumónicas, uno de ellos con bronconeumonía fibrinosa, incluyendo además lesiones probables de rinotraqueítis infecciosa bovina (1/9), y el otro con bronconeumonía supurativa y también miocarditis probable por *Histophilus somni* (1/9). Adicionalmente, un caso positivo estuvo asociado a anaplasmosis (1/9). Otros dos casos positivos presentaron una distintiva peritonitis fibrinosa (2/9). El resto de los animales de este grupo resultaron negativos a DVB (4/9). Las características histopatológicas de las lesiones y su asociación con el antígeno in situ, confirman la presencia de DVB. Esta presentación es compatible con el síndrome denominado infección aguda. Este es el primer informe de infección por DVB y otras patologías concomitantes en ganado de engorda en México.

**Palabras clave:** DIARRREA VIRAL BOVINA, INFECCIÓN AGUDA, GANADO EN CORRAL DE ENGORDA, INMUNOHISTOQUÍMICA.

Recibido el 25 de noviembre de 2011 y aceptado el 14 de mayo de 2012.

\*Cuerpo Académico de Patobiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Unidad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Francisco Villa s/n, col. Ex Hacienda El Canadá, 66050, Escobedo, Nuevo León.

\*\*MSD, Salud Animal, Santiago Tianguistenco, Estado de México.

\*\*\*Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, PEI, Canadá.

Responsable de correspondencia: Rafael Ramírez Romero, tel.: 81 13404390, ext. 3612, correo electrónico: raramirez@prodigy.net.mx

## Introduction

The bovine virus diarrhea (BVD) is a viral infection of cattle that appeared as a new disease over 50 years ago. Since then, infection has evolved into a multifaceted disease with varied clinical presentations. According to its pathogenesis, BVD has been considered the most complicated viral disease in cattle.<sup>1</sup>

The BVD virus belongs to the genus Pestivirus within the Flaviviridae family.<sup>2</sup> The genomic comparison of BVD has resulted in the recognition of two genotypes, BVD 1 and BVD 2.<sup>2</sup> Additionally, each of these genotypes occur as cytopathic or non-cytopathic biotypes.<sup>2</sup>

In order to understand the infection pathogenesis of BVD, four main syndromes have been proposed: acute infection, intrauterine infection, persistent infection and mucosal disease.<sup>3</sup> Intrauterine infection is caused by an acute infection in a pregnant female that infects its product and can give birth to an animal persistently infected (PI). The highest probability of generating PI animals occurs between the first and third months of gestation.<sup>3</sup> In turn, persistent infection is the most important way of disease spreading, besides being an important factor for the development of mucosal disease.<sup>3</sup>

Acute infection occurs as a temporary infection in susceptible, immunocompetent animals that are BVD-virus seronegative. In this syndrome the term "acute" does not refer to the course of the disease but to the initial or primary viral infection.<sup>3</sup> Commonly, PI animals are the source of infection.<sup>3</sup> In this case, the infection is subclinical or clinically at a low level of severity, being very difficult to recognize.<sup>3,4</sup> Generally, this presentation occurs concomitantly with severe pneumonic pathologies, since it causes immunosuppression in infected animals.<sup>3,4</sup>

Considering that infection with BVD virus is widely distributed in Mexico,<sup>5</sup> and taking into account that the collection of high risk animals is one of the most common conditions in feedlots, it is reasonable to expect that BVD might occur subclinically, but favoring the presentation of other pathological conditions such as pneumonia.<sup>6</sup> This paper presents the background and diagnostic pathology studies performed in several feedlots in Mexico, confirming this original assumption, partially.

During 2009 and 2010, several *post mortem* studies were conducted on cases considered representative of chronic pneumonic problems in different feedlots in Mexico. In addition, these pens reported outbreaks of anaplasmosis in different stages of fattening. The pens studied are located in Mexicali (Baja California), Culiacan (Sinaloa), Escobedo (Nuevo Leon) and Morelia

## Introducción

La diarrea viral bovina (DVB) es una infección viral del ganado que apareció como una enfermedad nueva hace más de 50 años. Desde entonces, la infección ha evolucionado hasta convertirse en una enfermedad multifacética con presentaciones clínicas variadas. De acuerdo con su patogenia, la DVB ha sido considerada la enfermedad viral más complicada en bovinos.<sup>1</sup>

El virus de la DVB pertenece al género Pestivirus dentro de la familia Flaviviridae.<sup>2</sup> La comparación genómica de los virus de DVB ha dado como resultado el reconocimiento de dos genotipos, DVB 1 y DVB 2.<sup>2</sup> Adicionalmente, cada uno de estos genotipos ocurren como biotipos citopáticos o no citopáticos.<sup>2</sup>

Para entender la patogénesis de la infección por la DVB se han propuesto cuatro síndromes principales: infección aguda, infección intrauterina, infección persistente y enfermedad de las mucosas.<sup>3</sup> La infección intrauterina es causada por una infección aguda en una hembra gestante que infecta a su producto y puede parir un animal persistentemente infectado (PI). La mayor probabilidad de que se generen animales PI ocurre entre los meses uno y tres de gestación.<sup>3</sup> A su vez, la infección persistente es la forma más importante de diseminación de la enfermedad, además de ser un factor relevante para el desarrollo de la enfermedad de las mucosas.<sup>3</sup>

La infección aguda ocurre como una infección temporal en animales susceptibles, inmunocompetentes y seronegativos al virus de la DVB.<sup>3</sup> En este síndrome el término agudo no hace referencia al curso de la enfermedad sino a la infección viral inicial o primaria.<sup>3</sup> Comúnmente, la fuente de infección son animales PI.<sup>3</sup> En este caso, la infección transcurre a nivel subclínico o clínicamente en un nivel de poca gravedad al grado de ser muy difícil de reconocer.<sup>3,4</sup> Por lo general, esta presentación acontece de manera concomitante con cuadros patológicos graves de neumonías, ya que provoca inmunosupresión en los animales infectados.<sup>3,4</sup>

Al considerar que la infección por el virus de DVB se encuentra ampliamente distribuida en México,<sup>5</sup> y tomando en cuenta que el acopio de animales de alto riesgo es una de las condiciones más comunes en las engordas, es razonable esperar que la DVB pudiera ocurrir de manera subclínica, pero favoreciendo la presentación de otros cuadros patológicos como el de la neumonía.<sup>6</sup> En este trabajo se presentan los antecedentes y los estudios de patología diagnóstica que se realizaron en varios corrales de engorda en México, que confirman, en parte, esta suposición original.

Durante 2009 y 2010 se realizaron varios estudios post mórtem de casos considerados representativos

(Michoacan), Mexico. There are between 25,000 and 50,000 animals in these farms. The handling of animals on arrival included the routine use of different immunogens against clostridial diseases (*Clostridium chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens* C and D toxoids, *C. sordellii*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*) and respiratory virus (infectious bovine rhinotracheitis [IBR], parainfluenza-3 [PI3], bovine virus diarrhea [BVD], bovine respiratory syncytial virus [BRSV]). Furthermore, any feedlots considered risky by the spread of respiratory illnesses (with more than 25% morbidity upon arrival), a parenteral dose of long-acting antibiotic at therapeutic doses (tilmicosin, 10 mg / kg, SC) was administered to all animals in the lot (metaphylaxis, mass treatment).

After the third day, when no favorable clinical response was appreciated in the animals still showing fever, cough, lassitude, nasal discharge, conjunctivitis, and dyspnea, cattle were removed to the infirmary where they received the protocol for relapsed animals. This protocol consisted of two different antibiotic administrations at three-day intervals. Oxytetracycline (30 mg / kg, IM) and enrofloxacin (5 mg / kg, IM) were used as the first and second treatment, respectively. In this paper, animals of both sexes, ranging from eight to fourteen months of age were used. These animals also received metaphylaxis at arrival and then the protocol for relapsed animals; they did not recover so it was decided to euthanize them.

The samples included belonged to two groups called retrospective and prospective. The retrospective group (n = 6) included animals with pneumonic lesions characteristic of *Mycoplasma bovis*. This agent was subsequently confirmed by immunohistochemistry (IHC).<sup>6</sup> The prospective group (n = 9) was formed by animals with other diseases, including pneumonia, but did not have the particular characteristics of pneumonia caused by *Mycoplasma*. Histopathology samples were kept in buffered 10% formaldehyde solution and subsequently embedded in paraffin, sectioned at 4 µm thick and dyed with H & E and periodic acid-Schiff (PAS). The process was conducted at the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Autonoma de Nuevo Leon.

Considering the value of the histological findings in both groups, it was decided to confirm the presence of BVD by IHC. The procedure was carried out using new sections of the same paraffin block. Tissues included small intestine (ileum) and myocardium. The sections were deparaffinized and processed using monoclonal antibodies against BVD conjugates with avidin-biotin immunoperoxidase, using the chromogen diaminobenzidine as substrate. They were then counterstained with hematoxylin.<sup>7</sup> This procedure was performed at the Prairie Diagnostic Services in Saskatoon, Saskatche-

de problemas neumónicos crónicos en diferentes corrales de engorda en México. Además, también se registraron en estos corrales, brotes de anaplasmosis en diferentes etapas del proceso de engorda. Los corrales estudiados se localizan en Mexicali (Baja California), Culiacán (Sinaloa), Escobedo (Nuevo León) y Morelia (Michoacán). En estas explotaciones el número oscila entre 25,000 y 50,000 animales. El manejo de los animales a su arribo incluía la aplicación rutinaria de inmunógenos contra diferentes enfermedades clostridiales (*Clostridium chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens* C y D con toxoides, *C. sordellii*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*) y respiratorias virales (rinotraqueítis infecciosa bovina [RIB], parainfluenza-3 [PI3], diarrea viral bovina [DVB], virus respiratorio sincicial bovino [VRSB]). Además, en aquellos lotes considerados de riesgo por la diseminación de enfermedades respiratorias (con morbilidad superior a 25% a su arribo), se administraba parenteralmente una dosis de antibiótico con acción prolongada en dosis terapéutica (tilmicosina, 10 mg/kg, SC) a todos los animales del lote (metafilaxia, tratamiento masivo).

Después del tercer día, cuando no se apreciaba en los animales una respuesta clínica favorable y aún presentaban fiebre, tos, lasitud, secreción nasal, conjuntivitis y disnea, los bovinos eran trasladados a la enfermería en donde recibían el protocolo para animales recaídos. Este protocolo consistía en dos administraciones de antibióticos diferentes con intervalo de tres días. Se empleó oxitetraciclina (30 mg/kg, IM) y enrofloxacin (5 mg/kg, IM) como primer y segundo tratamiento, respectivamente. En el presente trabajo, se utilizaron animales de ambos sexos, cuyas edades oscilaban entre ocho y catorce meses de edad. Estos animales, además de recibir metafilaxia en recepción y posteriormente el protocolo para animales recaídos, no se recuperaron, por lo que se decidió practicarles eutanasia.

Las muestras incluidas pertenecían a dos grupos denominados retrospectivo y prospectivo. El grupo retrospectivo (n = 6) incluyó animales con lesiones neumónicas características de *Mycoplasma bovis*. Este agente etiológico fue posteriormente confirmado mediante inmunohistoquímica (IHQ).<sup>6</sup> El grupo prospectivo (n = 9) fue conformado por animales que presentaban otras patologías, incluso neumonías, pero que no tenían las características particulares de las neumonías causadas por *Mycoplasma*. Las muestras para histopatología se mantuvieron en solución amortiguada de formaldehído al 10% para posteriormente incluirse en parafina, seccionarse a 4 µm de espesor y teñirse con H&E y la tinción del ácido peryódico de Schiff (PAS). El proceso se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

wan, Canada, under the Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Canada.

*Post mortem* diagnoses of the six cases of the retrospective group were: suppurative bronchopneumonia and severe and chronic bronchiectasis, with extensions of 50 to 80%. The exudate in abscessed bronchi was caseous (6/6). Other findings were: pleuritis and abscesses as a result of large sequestered necrotic lesions. Histopathological studies confirmed the macroscopic observations. The presence of *Mycoplasma bovis* was confirmed by IHC. These results have been previously published.<sup>6</sup>

Subsequently, *post mortem* diagnoses for the nine animals included in the prospective group were: severe, subacute, fibrinous suppurative bronchopneumonia, with marked fibrinous necrotic tracheitis with diphtheritic plates attached, probably due to IBR (1/9). Severe and chronic suppurative bronchopneumonia was observed in another case, along with pale areas (infarcts) in the interventricular septum and papillary muscles of the left heart, compatible with *Histophilus somni* (1/9). Another animal had dehydration, watery blood in subcutaneous tissue, jaundice, brick-colored liver, enlarged spleen and gallbladder plethora with thick bile. Anaplasmosis was diagnosed by blood smear in this animal (1/9). Four animals had fibrinous purulent peritonitis (4/9). In these animals the pneumonic lesion was incipient and the diagnosis was attributed to peritonitis. Fibrinous exudate was adhered on the surface of the mesenteric lymph nodes and the serosa of the small intestine in these cases. Perforated ulcers were not recognized. Finally, macroscopic changes were not relevant or specific in two other cases (2/9). Microscopically, morphologic diagnoses for the prospective group confirmed *post mortem* diagnoses. For the two cases in which no significant injuries were recognized macroscopically, the following was reported: membranous proliferative glomerulonephritis with vasculitis and severe, chronic interstitial nephritis, lymphoplasmacytic myocarditis with fibrinoid necrosis and chronic, multifocal, mild vasculitis.

Histological lesions consistent with BVD were observed in the small intestine from both groups, retrospective and prospective. These injuries justified the inclusion of all cases for BVD diagnosis by IHC. The description of these lesions was: small bowel (ileum), marked atrophy of the submucosal lymphoid tissue with collapsed follicular structures, causing the projection of the crypts over lymphoid tissue. In some areas, the crypts were observed disorganized and dilated with epithelial necrosis and detritus (radiomimetic damage) (Figure 1), along with lymphoplasmacytic infiltrate in the lamina propria. The submucosa showed edema, some blood vessels presented hyalinization and lymphocytic vasculitis in its walls. There was

Considerando el valor de los hallazgos histopatológicos en ambos grupos, se decidió confirmar mediante IHQ la presencia de DVB. El procedimiento se realizó empleando nuevas secciones de los mismos bloques de parafina. Se incluyeron tejidos de intestino delgado (íleon) y miocardio. Las secciones se desparafinaron y se procesaron empleando anticuerpos monoclonales para DVB conjugados con el complejo avidina-biotina inmunoperoxidasa, empleando el cromógeno diaminobenzidina como sustrato. Posteriormente, fueron contrastados con hematoxilina.<sup>7</sup> Este procedimiento se realizó en el laboratorio de diagnóstico Prairie Diagnostic Services en Saskatoon, Saskatchewan, Canadá, dependiente del Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Canadá.

El diagnóstico *post mortem* de los seis casos del grupo retrospectivo fue: bronconeumonía supurativa y bronquiectasia severa y crónica, con extensiones de 50 a 80%. El exudado en bronquios abscedados era caseoso (6/6). Otros hallazgos fueron: pleuritis y grandes abscesos como resultado de lesiones necróticas secuestradas. Los estudios histopatológicos confirmaron las observaciones macroscópicas. La confirmación de *Mycoplasma bovis* se realizó mediante IHQ. Estos resultados han sido publicados anteriormente.<sup>6</sup>

Posteriormente, entre los nueve animales incluidos en el grupo prospectivo, los diagnósticos *post mortem* fueron: bronconeumonía fibrino supurativa, severa, subaguda, con una marcada traqueítis fibrino necrótica con placas diftéricas adheridas, por probable RIB (1/9). En otro caso se reconoció una bronconeumonía supurativa, severa y crónica y además, zonas pálidas (infartos) en el septo interventricular y los músculos papilares del corazón izquierdo, compatible con *Histophilus somni* (1/9). Otro animal presentó deshidratación, sangre acuosa en tejido subcutáneo, ictericia, hígado de color ladrillo, esplenomegalia y plétora en vesícula biliar con una bilis espesa. En este animal se diagnosticó anaplasmosis mediante frotis sanguíneo (1/9). Cuatro animales presentaron peritonitis fibrino purulenta (4/9). En estos animales la lesión neumónica fue incipiente y el diagnóstico se atribuyó a la peritonitis. En estos casos, el exudado fibrinoso se encontraba adherido sobre la superficie de los ganglios mesentéricos y la serosa de intestino delgado. No se reconocieron úlceras perforadas. Finalmente, en otros dos casos, los cambios macroscópicos no fueron relevantes ni específicos (2/9). Microscópicamente, los diagnósticos morfológicos para el grupo prospectivo confirmaron los diagnósticos *post mortem*. Para los dos casos en los cuales no se reconocieron lesiones relevantes macroscópicamente se refirió lo siguiente: glomerulonefritis membrano proliferativa con vasculitis y nefritis intersticial, severa, crónica, y miocarditis linfoplasmocítica con necrosis fibrinoide y vasculitis moderada, crónica, multifocal.



marked edema in submucosa in the large intestine (cecum). Small vessels in the submucosa showed adjacent lymphoid infiltration. The lamina propria of the mucosa appeared infiltrated with lymphocytes and plasma cells, and epithelial necrosis of the base of the dilated crypts and presence of detritus. The morphological diagnosis (usually nested in the second or third place because pneumonic lesions were prioritized) was: lymphoplasmacytic enterocolitis with marked atrophy of the associated lymphoid tissue, necrosis of the crypt epithelium and chronic, diffuse, moderate vasculitis.

IHC results showed immune reactivity to BVD in all animals from the retrospective group and in five of nine animals from the prospective group. In this group the negative results corresponded to two animals with peritonitis and two animals with no significant injuries at necropsy. However, they all showed microscopic lesions suggestive of BVD.

In positive cases, the immune reactivity to DVB showed varying degrees of intensity, varying also the positivity of the reaction in the tissues studied. As an example, in heart, foci of increased reactivity were noted on the tunica media of arteries and to a lesser degree in some interstitial cells and Purkinje fibers (Figure 2). In small intestine, the positivity was recognized in the Peyer's patches (Figure 3) and the wall of blood vessels, and with less intensity in the epithelial cells of the crypts. When atrophy of lymphoid tissue in Peyer's patches was very marked, the immunoreactivity was observed individually in remnant cells of lymphoid follicles (Figure 4). No immune reactivity was recognized in the spleen.

It has been reported that cases of respiratory disease in cattle feedlots occur with a longer course and show up until later in life, compared with that observed 20 years ago in the United States of America and Canada.<sup>8</sup> This situation was related to infection by *Mycoplasma bovis* and BVD.<sup>7-9</sup> It is believed that the presence of *Mycoplasma* in subacute and chronic pneumonic cases can be related to the entry of younger animals, and therefore more susceptible to enzootic pneumonia.<sup>10</sup> In this regard, all studied feedlots confirmed the risk for respiratory diseases, including entry to light animals to the pen ( $\leq 180$  kg) without preventive management, collected in centers with poor sanitary conditions and then transported over long distances.

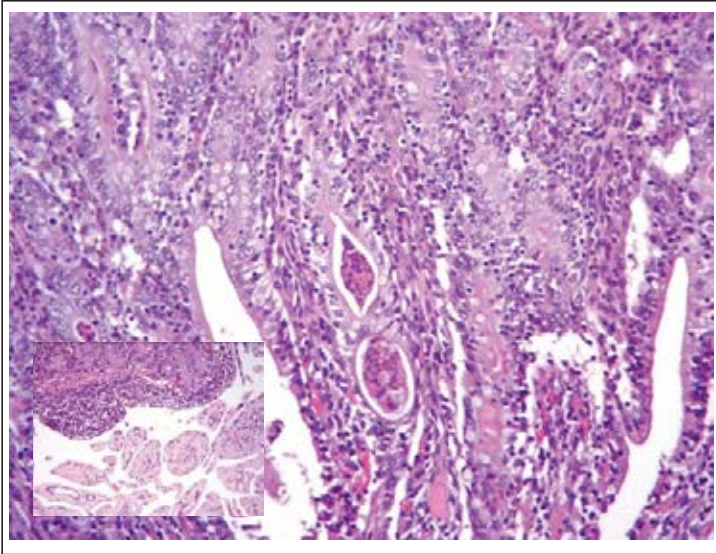
Some studies<sup>7-12</sup> have shown the association of chronic pneumonia caused by *Mycoplasma* and BVD. Although it is known that BVD can enhance any other problems and even pneumonia.<sup>12</sup> The authors of this paper published a report on chronic pneumonic lesions and its immune reactivity to *Mycoplasma bovis*; six animals which tested positive for *Mycoplasma bovis*<sup>6</sup> back then, were positive to BVD here (retrospective group). Conversely, BVD has been associated with myocardi-

En ambos grupos, retrospectivo y prospectivo, se apreciaron lesiones histológicas consistentes con DVB en intestino delgado. Estas lesiones justificaron la inclusión de todos los casos para el diagnóstico de DVB mediante IHQ. La descripción de estas lesiones fue: intestino delgado (íleon), marcada atrofia del tejido linfoide en submucosa con colapso de las estructuras foliculares, lo que provocó la proyección de las criptas sobre el tejido linfoide. En algunas áreas, las criptas se observaron desorganizadas y dilatadas con necrosis epitelial y detritus (daño radiomimético) (Figura 1), así como infiltrado linfoplasmocítico en lámina propia. En la submucosa se pudo apreciar edema, algunos vasos sanguíneos mostraron hialinización en su pared y vasculitis linfocítica. En intestino grueso (ciego), se observó marcado edema en submucosa. Los pequeños vasos de la submucosa presentaron infiltración linfoide adyacente. La lámina propia de la mucosa apareció infiltrada por linfocitos y células plasmáticas, así como necrosis epitelial de la base de las criptas con dilatación y presencia de detritus. El diagnóstico morfológico (jerarquizado por lo general en segundo o tercer lugar porque las lesiones neumónicas fueron priorizadas) fue: entero-colitis linfoplasmocítica con marcada atrofia del tejido linfoide asociado, necrosis del epitelio de criptas y vasculitis moderada, crónica, difusa.

Los resultados de IHQ demostraron una inmuno reactividad a DVB en todos los animales del grupo retrospectivo y en cinco de nueve animales del grupo prospectivo. En este grupo los resultados negativos correspondieron a dos animales con peritonitis y a los dos animales que no presentaron lesiones relevantes en la necropsia. No obstante, en todos ellos se apreciaron lesiones microscópicas sugestivas de DVB.

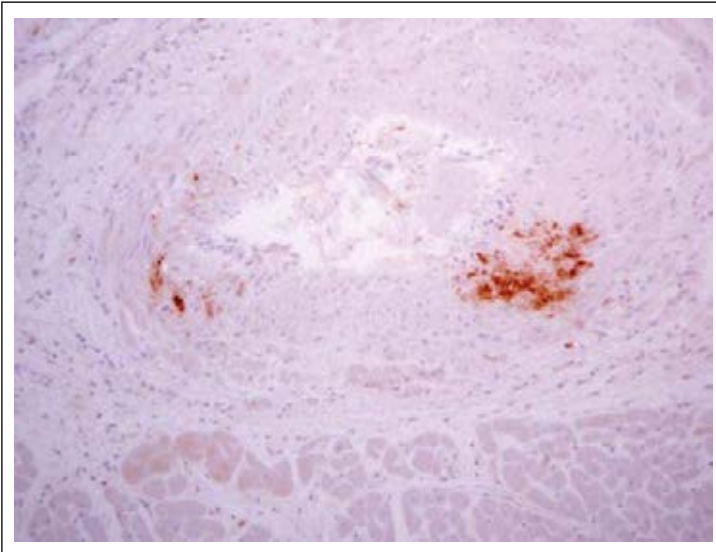
En los casos positivos la inmuno reactividad a DVB mostró diversos grados de intensidad, variando también la positividad de la reacción en los tejidos estudiados. Por ejemplo: en corazón, los focos de reactividad mayor se apreciaron sobre la túnica media de arterias y con menor intensidad en algunas células intersticiales y fibras de Purkinje (Figura 2). En intestino delgado, la positividad fue reconocida en las placas de Peyer (Figura 3) y la pared de vasos sanguíneos, y con menor intensidad en las células epiteliales de las criptas. Cuando la atrofia del tejido linfoide en las placas de Peyer fue muy marcada, la inmuno-reactividad se apreció individualmente en células remanentes de los folículos linfoides (Figura 4). La inmuno reactividad no se reconoció en bazo.

Se ha informado que los cuadros de enfermedad respiratoria en bovinos en corral de engorda ocurren con un curso más largo y se presentan más tardíamente, en comparación con lo observado hace 20 años en Estados Unidos de América y Canadá.<sup>8</sup> Esta situación



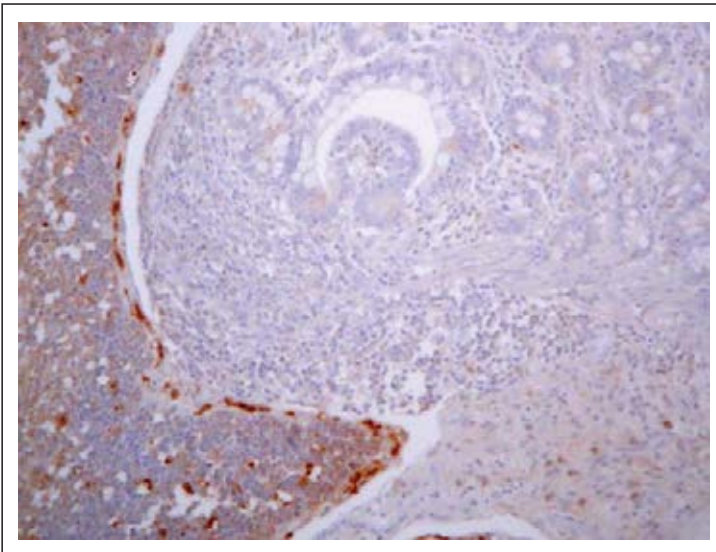
**FIGURA 1.** Intestino delgado (íleon). Se muestra la mucosa intestinal con infiltración linfóide en lámina propia. Hay necrosis del epitelio, particularmente evidente en las criptas. Algunas criptas se aprecian distendidas por detritus en su interior (daño radiomimético). H&E, barra 50 µm. En el recuadro se presenta la severa atrofia del tejido linfóide asociado (placa de Peyer) en la submucosa. Esta lesión fue constante en todos los casos incluidos, tanto en el grupo retrospectivo como en el prospectivo.

**FIGURE 1.** Small intestine (ileum). The intestinal mucosa with lymphoid infiltration in the lamina propria is shown. There is necrosis of the epithelium, particularly evident in the crypts. Some crypts are distended with debris inside (radiomimetic damage). H & E, bar 50 µm. An inset shows the severe atrophy of the associated lymphoid tissue (Peyer's patches) in the submucosa. This lesion was constant in all cases included in both, the retrospective and prospective data.



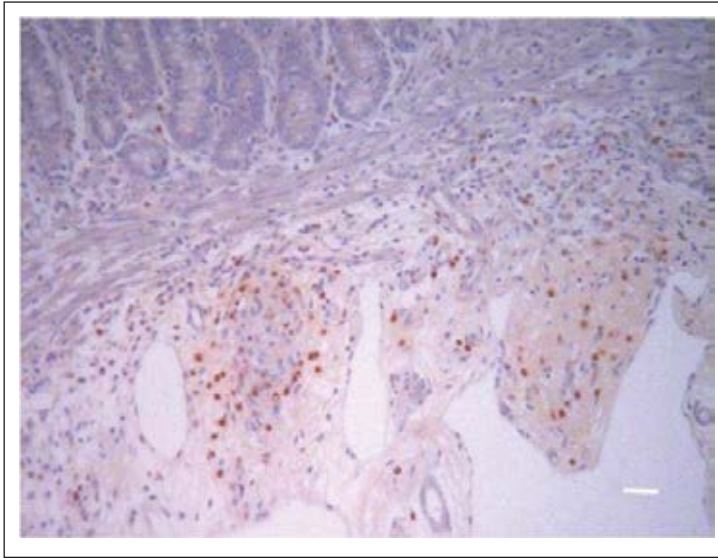
**FIGURE 2.** Corazón. Se muestra una arteria grande que presenta necrosis fibrinoide y una intensa inmunoreacción en la media. Hay un discreto infiltrado linfóide adyacente. Este caso corresponde a un animal incluido en el grupo retrospectivo. Inmunohistoquímica, barra 50 µm.

**FIGURE 2.** Heart. A large artery with fibrinoid necrosis and an intense immunoreaction in the media is depicted. There is a discrete adjacent lymphoid infiltrate. This case corresponds to an animal included in the retrospective group. Immunohistochemistry, bar 50 µm.



**FIGURA 3.** Intestino delgado (íleon) con tejido linfóide asociado (placa de Peyer). Resulta evidente la inmunoreactividad en el tejido linfóide, sobre todo en el margen del folículo. Las criptas en la mucosa muestran hiperplasia de restauración y se proyectan sobre el tejido linfóide de la submucosa. Este caso corresponde a un animal incluido en el grupo prospectivo. Inmunohistoquímica, barra 50 µm.

**FIGURE 3.** Small intestine (ileum) with associated lymphoid tissue (Peyer's patch). The immunoreactivity in lymphoid tissue is clearly seen, especially in the margin of the follicle. The crypts in the mucosa show hyperplasia and restoration and are projected over the lymphoid tissue of the submucosa. This case corresponds to an animal included in the prospective group. Immunohistochemistry, bar 50 µm.



**FIGURA 4.** Intestino delgado (íleon) con tejido linfoide asociado (placa de Peyer). Resulta evidente la marcada atrofia del tejido linfoide en la submucosa; no obstante, algunas células remanentes muestran inmunoreactividad. Este caso corresponde a un animal incluido en el grupo prospectivo. Inmunohistoquímica, barra 50  $\mu$ m.

**FIGURE 4.** Small intestine (ileum) with associated lymphoid tissue (Peyer's patch). The marked atrophy of lymphoid tissue in the submucosa is clearly observed; however, some remaining cells show immuno-reactivity. This case corresponds to an animal included in the prospective group. Immunohistochemistry, bar 50  $\mu$ m.

al lesions caused by *Histophilus somni*,<sup>13</sup> and it is also known to reactivate BIR cases.<sup>3</sup> All this corresponds to the prime infection or acute infection by BVD and is consistent with the information presented here.

In this report the association of BVD and anaplasmosis in one case is important. Anaplasmosis is an endemic disease in Mexico<sup>14</sup> and it is likely that many animals arrive at the corral with subclinical cases that can reactivate and cause clinical disease in the presence of BVD co-infection. This association has been demonstrated recently in South Africa in a fatal case of congenital anaplasmosis in a newborn who died at 10 days of age and who also tested positive for BVD, like its mother.<sup>15</sup>

Weariness and lameness have been previously reported in Mexico in registered Simmental cows, imported the United States of America, with seropositivity to bluetongue and BVD.<sup>16</sup> In this case, it was assumed that the concomitance of BVD and bluetongue caused a synergistic effect, leading to progressive wasting and lameness that forced the disposal of the animals.<sup>16</sup> The BVD negative impact has also been referred on the productive parameters of beef cattle in northeastern Mexico.<sup>17</sup>

Finally, in both cases where pneumonia was not a major injury and the predominant lesion was peritonitis, a concurrent etiology could not be established. However, it is known that severe lesions in the intestine, caused by BVD virus and opportunistic bacterial infections, can cause exudation on the intestinal serosal, and consequently peritonitis.<sup>4</sup> In an experimental bovine infection, the predominant lesion was peritonitis.<sup>18</sup>

A study based on IHC on skin samples from ears of slaughtered animals was carried out in Mexico City, in order to recognize the presence of persistently infect-

se vio relacionada con infecciones por *Mycoplasma bovis* y DVB.<sup>7-9</sup> Se cree que la presencia de *Mycoplasma* en cuadros neumónicos subagudos y crónicos puede estar relacionada con la entrada de animales más jóvenes y, por ende, más susceptibles a padecer neumonía enzoótica.<sup>10</sup> Al respecto, en todas las engordas revisadas se confirmó el riesgo a enfermedades respiratorias, incluyendo la entrada al corral de animales ligeros ( $\leq 180$  kg), sin manejo preventivo, acopiados en centros con poca atención sanitaria y posteriormente transportados por largas distancias.

En algunos trabajos<sup>7-12</sup> se ha demostrado la asociación de neumonías crónicas causadas por *Mycoplasma* y DVB, si bien se sabe que DVB puede potenciar cualquier neumonía e incluso otros problemas.<sup>12</sup> Los autores del presente trabajo publicaron un informe sobre lesiones neumónicas crónicas y su immuno reactividad a *Mycoplasma bovis*; seis animales que resultaron positivos entonces a *Mycoplasma bovis*<sup>6</sup> también resultaron positivos a DVB aquí (grupo retrospectivo). Por otra parte, DVB se ha asociado con lesiones en miocardio causadas por *Histophilus somni*,<sup>13</sup> y se sabe que también reactiva cuadros de RIB.<sup>3</sup> Todo ello corresponde con la primo infección o infección aguda por DVB<sup>3</sup> y concuerda con la información que aquí se presenta.

En el presente informe la asociación de DVB y anaplasmosis en un caso resulta importante. La anaplasmosis es una enfermedad enzoótica en México<sup>14</sup> y es muy probable que muchos animales arriben a los corrales con cuadros subclínicos que, en presencia de una infección concomitante por DVB, puedan reactivarse y provocar enfermedad clínica. Esta asociación ha sido demostrada recientemente en Sudáfrica en un caso fatal de anaplasmosis congénita en un neonato que murió a los 10 días de edad y que además, resultó positivo a DVB, al igual que su madre.<sup>15</sup>



ed animals.<sup>19</sup> However, according to the information collected to prepare this report, the presence of cattle lesions caused by BVD had not been demonstrated in Mexico.

As recorded in this study, the syndrome called "acute infection" refers to a primary infection in susceptible animals, evolving mostly subclinically and, therefore, acting as predisposing or trigger factor for other diseases.<sup>3,4</sup> However, this presentation of the disease has been related to subacute or chronic histological lesions, particularly in blood vessels, attributed to the virus,<sup>3,4,20</sup> similar to those described here. In this report, the intestinal lymphoid tissue atrophy and finally the radiomimetic damage in the crypts, were evidence of the disease.<sup>3,4,20</sup> However, the intensity of the vascular lesions in myocardium were most obvious and resulted in correspondence with increased immunoreactivity, as already noted in natural cases.<sup>3,4,11,13</sup> This consistent pattern of severity and immune reactivity of cardiac lesions, has also been referred in calves in which acute infection with BVD was experimentally replicated.<sup>20</sup>

Despite the characteristic histological lesions, no immune reactivity was recognized in four cases of the prospective group. Previous works have mentioned absence of immune reactivity in patients with typical histological lesions in both, natural and experimental infections, but there is no categorical explanation for this.<sup>7,20</sup> It has been simply mentioned that there is no antigen presence in these lesions, perhaps because of the viral infection stage and its elimination by the immune response.<sup>7,20</sup> Because of this, enough samples should be obtained to have more opportunity to recognize the association between lesion and immune reactivity.<sup>7</sup>

The demonstration of BVD antigen in characteristic lesions by IHC, confirms the presence of the disease in cattle in feedlots in Mexico. *Mycoplasma bovis* pneumonia in the retrospective group corresponded completely (100%) to the presence of BVD. It was also demonstrated in the prospective group, that BVD may aggravate or reactivate other infections.

## Acknowledgements

This study was carried out with funds from the Program to Support Scientific and Technology Research of the Autonomous University of Nuevo Leon (UANL PAICYT-GCT027-10). MSD Animal Health also supported for the development of the field work.

## Referencias

1. DEREGT D. Introduction and history. In: GOYAL SM, RIDPATH JF, editors. Bovine Viral Diarrhea Virus. Diagnosis, Management and Control. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2005: 3-33.

Previamente se ha referido en México la presentación de desmedro y cojeras en vacas Simmental de registro, importadas de Estados Unidos de América, con seropositividad hacia lengua azul y DVB.<sup>16</sup> En este caso, se supuso que la concomitancia de DVB y lengua azul provocó un efecto sinérgico y causó emaciación y claudicación progresiva que obligó a desechar a los animales.<sup>16</sup> También se ha referido el impacto negativo de DVB en los parámetros productivos de lotes de ganado de carne en el noreste de México.<sup>17</sup>

Por último, en los dos casos en los que la neumonía no fue una lesión importante y que presentaron una lesión predominante de peritonitis, no pudo establecerse una etiología concurrente definida. No obstante, se sabe que lesiones severas en intestino, causadas por el virus de DVB e infecciones bacterianas oportunistas, pueden provocar una exudación sobre la serosa intestinal y, en consecuencia, peritonitis.<sup>4</sup> En una infección experimental de un bovino, la lesión predominante fue peritonitis.<sup>18</sup>

Para reconocer la presencia de animales persistentemente infectados se realizó, en un rastro de la Ciudad de México, un trabajo en el que se empleó IHQ en muestras de piel de orejas de animales sacrificados.<sup>19</sup> No obstante, de acuerdo con la información recabada para la realización del presente informe, no se había demostrado que la presencia de DVB provocara lesiones en bovinos en México.

Tal y como se ha registrado en el presente trabajo, el síndrome denominado infección aguda se refiere a una primo infección en animales susceptibles, que evoluciona mayormente de manera subclínica y que acontece como factor predisponente o desencadenante de otras enfermedades.<sup>3,4</sup> No obstante, en esta presentación de la enfermedad se han referido lesiones histológicas subagudas o crónicas, particularmente en vasos sanguíneos, atribuidas al virus,<sup>3,4,20</sup> similares a las que aquí se describieron. En el presente informe la atrofia del tejido linfoide intestinal y finalmente el daño radiomimético en las criptas, fueron evidencias de la enfermedad.<sup>3,4,20</sup> Sin embargo, la intensidad de las lesiones vasculares en miocardio fueron más obvias y resultaron en correspondencia con una mayor inmuno reactividad, como ya se ha señalado en casos naturales.<sup>3,4,11,13</sup> Este patrón concordante de severidad e inmuno reactividad de las lesiones cardiacas, también se ha referido en becerros en los que se replicó experimentalmente la infección aguda con DVB.<sup>20</sup>

A pesar de las lesiones histológicas características no se reconoció inmuno reactividad en cuatro casos del grupo prospectivo. En trabajos anteriores se ha mencionado ausencia de inmuno reactividad en casos con lesiones histológicas típicas, tanto en casos naturales como en infecciones experimentales, pero no hay una explicación categórica para ello.<sup>7,20</sup> Se ha mencio-



2. RIDPATH JF. Classification and molecular biology. In: GOYAL SM, RIDPATH JF, editors. Bovine Viral Diarrhea Virus. Diagnosis, Management and Control. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2005: 65-80.
3. LIEBLER-TENORIO EM. Pathogenesis. In: GOYAL SM, RIDPATH JF, editors. Bovine Viral Diarrhea Virus. Diagnosis, Management and Control. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2005: 121-143.
4. BROWN CC, BAKER DC, BARKER IK. Alimentary system. In: MAXIE MG, editor. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5<sup>th</sup> ed. Vol 2, Ch 1. St. Louis Missouri: Saunders Elsevier, 2007: 140-148.
5. SUZAN VM, ONUMA M, AGUILAR RE, MURAKAMI Y. Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. Jpn J Vet Res 1983; 31:125-132.
6. RAMÍREZ ROMERO R, CHAVARRÍA MARTÍNEZ B, NEVÁREZ GARZA AM, RODRÍGUEZ TOVAR LE, DÁVILA MARTÍNEZ C, HERNÁNDEZ VIDAL G *et al.* Demostración inmunohistoquímica de *Mycoplasma bovis* en lesiones neumónicas crónicas en ganado en corral de engorda. Vet Méx, 2010;41:289-296.
7. SHAHRIAR FM, CLARK EG, JANZEN E, WEST K, WOBESER G. Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. Can Vet J 2002; 43:863-868.
8. FULTON RW, BLOOD KS, PANCIERA RJ, PAYTON ME, RIDPATH JF, CONFER AW *et al.* Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. J Vet Diagn Invest 2009; 21:464-77.
9. GAGEA MI, BATEMAN KG, SHANAHAN RA, VAN DREUMEL T, MCEWEN BJ, CARMAN S *et al.* Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. J Vet Diagn Invest 2006;18:29-40.
10. GRIFFIN D. Bovine pasteurellosis and other bacterial infections of the respiratory tract. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2010;26:57-71.
11. HAINES DM, MARTIN KM, CLARK EG, JIM GK, JANZEN ED. The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. Can Vet J 2001; 42:857-860.
12. BOOKER CW, ABUTARBUSH SM, MORLEY PS, KEE JIM G, PITTMAN TJ, SCHUNICHT OC *et al.* Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of feedlot cattle in western Canada. Can Vet J 2008;49:473-481.
13. HAINESDM, MOLINEKM, SARGENTRA, CAMPBELL JR, MYERS DJ, DOIG PA. Immunohistochemical study of *Hemophilus somnus*, *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia hemolytica*, and bovine viral diarrhea virus in death losses due to myocarditis in feedlot cattle. Can Vet J 2004; 45:231-234.

nado simplemente que en estas lesiones ya no hay presencia de antígeno, quizá debido a la etapa de la infección viral y su eliminación por la respuesta inmune del animal.<sup>7,20</sup> Debido a lo anterior, se recomienda tomar suficientes muestras para tener mayor oportunidad de reconocer la asociación entre lesiones e inmuno reactividad.<sup>7</sup>

La demostración del antígeno de DVB en lesiones características mediante IHQ, confirma la presencia de la enfermedad en bovinos en corral de engorda en México. Las neumonías por *Mycoplasma bovis* en el grupo retrospectivo correspondieron, en su totalidad (100%), a la presencia de DVB. Asimismo, se demuestra en el grupo prospectivo que DVB puede agravar o reactivar otros cuadros patológicos infecciosos.

## Agradecimientos

El presente trabajo se realizó con recursos del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León (PAICYT-UANL GCT027-10). Se contó también con el apoyo de MSD Salud Animal para el desarrollo de los trabajos de campo.

14. FIGUEROA MILLÁN JV, ROJAS RAMÍREZ EE, RAMOSARAGÓNJA, GRANJENOCOLÍNG, GARCÍA ORTÍZ MA, CANTO ALARCÓN GJ *et al.* Evaluación en condiciones de campo de la vacuna inactivada de *Anaplasma marginale* denominada Plazvax. Vet Méx 1999;30: 221-225.
15. PYPERS AR, HOLM DE, WILLIAMS JH. Fatal congenital anaplasmosis associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a crossbred calf. J S Afr Vet Assoc 2011; 82:179-182.
16. RAMÍREZ-ROMERO R, AVALOS-RAMÍREZ R, SALINAS-MELÉNDEZ JA, ZÁRATE-RAMOS JJ. Descripción de un brote de claudicación en bovinos asociado con la seropositividad a los virus de la lengua azul y diarrea viral bovina. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría; 1995 agosto 24-26; Torreón Coahuila, México. México, DF: Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1995: 87-90.
17. MELLADO BM, GONZÁLEZ DH, UDAVE LM. Comportamiento reproductivo y peso de los becerros en un hato de bovinos productor de carne, infectado con diarrea viral bovina. Vet Méx 1996;27: 179-183.
18. TESSARO SV, CARMAN PS, DEREGT D. Viremia and virus shedding in elk infected with type 1 and virulent type 2 bovine viral diarrhea virus. J Wildl Dis 1999; 35:67-677.
19. VALENCIA-MORALES EV, MORALES-SALINAS E, SÁNCHEZ-GODOY FD, SALMERÓN-SOSA F. Detección del virus de diarrea viral bovina por inmunohistoquímica y ELISA de captura de antígeno en animales persistentemente infectados. Memorias del

XV Congreso Nacional de Patología Veterinaria; 2006 junio 21-23; Zacatecas Zacatecas, México. Zacatecas, Zacatecas, México: Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, AC, 2006: 20-27.

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