

Identificación de agentes virales por inmunohistoquímica en enfermedades respiratorias de bovinos en corral de engorda

Viral participation in respiratory disease in feedlot cattle, as identified by immunohistochemistry

Felipe Juárez Barranco *
Francisco J. Trigo Tavera **
Gilberto Chávez Gris**
Raúl E. Vargas García ***

Abstract

Bovine respiratory disease in feedlot cattle is an important cause of economic loss. Among the possible agents, one can mention: infectious bovine respiratory virus (IBR), parainfluenza 3 virus (PI3) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV). These respiratory diseases have been widely studied in different countries, however, in Mexico, there is limited information on the participation of these agents in bovine pneumonias. The objective of this study was to determine the participation of these agents of bovine pneumonias in feedlot conditions. Forty-eight pneumonic samples were collected for pathologic and immunohistochemical studies from a feedlot farm located in Culiacan, in the state of Sinaloa, in Mexico. Exudative pneumonias represented 87.5% while 12.5% were lymphoproliferative. Immunohistochemistry applied to 24 lungs and 12 tracheas revealed 66.6% of the lungs positive to PI3 virus, 54.1% positive to BRSV and 33.3% of the tracheas positive to IBR virus. The pathological features of the pneumonias corresponded to previous reports. Immunohistochemistry was revealed to be an efficient technique in the identification of viral antigens. It is concluded that viral agents are commonly involved in bovine pneumonias, and that exudative inflammation is the most common pneumonic presentation.

Key words: BOVINE, FEEDLOT, PNEUMONIA, VIRUS.

Resumen

Las enfermedades respiratorias de los bovinos en engorda causan pérdidas económicas importantes. Entre los agentes virales involucrados se encuentran: herpes virus bovino I, virus de parainfluenza 3 y el virus respiratorio sincicial bovino. Las infecciones virales del aparato respiratorio se han estudiado en diversos países; sin embargo, en México se dispone de escasos informes sobre la participación de estos agentes en el desarrollo de neumonías. Con el objetivo de determinar la participación de estos agentes virales en enfermedades respiratorias de los bovinos de engorda, se colectaron 48 muestras de pulmones neumónicos para estudios anatomopatológicos y de inmunohistoquímica en un sistema de engorda intensiva de Culiacán, Sinaloa. Las neumonías exudativas ocuparon 87.5% y las linfoproliferativas 12.5%. La inmunohistoquímica

Recibido el 16 de enero de 2002 y aceptado el junio 24 de 2002.

* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa.

** Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

*** Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

aplicada a 24 pulmones y 12 tráqueas mostró 66.6% de pulmones positivos a virus de parainfluenza 3; 54.1% a virus respiratorio sincicial bovino y 33.3% de tráqueas al virus de rinotraqueítis infecciosa bovina. El tipo de neumonías observadas correspondió a lo ya descrito. La inmunohistoquímica resultó eficiente en la identificación de antígenos virales. Este estudio permite concluir que las neumonías exudativas fueron importantes, y que los virus respiratorios estuvieron presentes.

Palabras clave: BOVINOS, CORRAL DE ENGORDA, NEUMONÍA, VIRUS.

Introduction

Bovine respiratory diseases have been studied as independent entities, yet it is known that the presentation of said diseases is a mix of a series of factors and pathogens, which is why it is referred to as bovine respiratory disease complex (BRC).¹⁻⁴

In the feedlot, BRC is one of the main causes of economic loss,¹⁻⁵ with an estimated 640 million dollar loss in the United States.⁶ This respiratory complex is characterized clinically by fever, dyspnea, nasal discharge and evidence of pneumonia upon pulmonary auscultation.

The microorganisms responsible for BRC are viruses, bacteria and virus-bacteria interactions.^{1,7-9} Among those agents involved one can find: bovine herpes virus 1, responsible for infectious bovine rhinotracheitis (IBR), parainfluenza 3 virus (PI3) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV).^{1,3,10,11}

Respiratory tract viral infections have been described in several countries. Infectious bovine rhinotracheitis has been registered in Canada, USA, New Zealand, Australia, Great Britain, South Africa and Europe.^{12,13} In Mexico the virus has been detected in several regions^{14,15} and serology shows a 16 to 70% prevalence in beef cattle.^{1,16} Infections with PI3 have worldwide distribution.¹⁷ Serological studies in Mexico indicate that infection with this virus is widely distributed among Mexican cattle, with 16 to 86% of animals testing positive.^{1,18} In the case of BRSV, isolation has been accomplished in most European countries, in America, Australia, Japan and northern Africa.¹⁷ In Mexico, serology detects the existence of antibodies against this virus in finishing cattle as well as in dairy cattle, with prevalence ranging from 19 to 78%.^{16,19,20}

Though there is ample documentation as to the participation of the above-mentioned agents in respiratory disease in Mexican cattle, there is no information concerning these pathologies in production centers.

The objective of this study was to describe the lesions and determine the frequency of these viral agents in the respiratory diseases of feedlot cattle.

Introducción

Las enfermedades respiratorias de los bovinos se han estudiado como entidades independientes; sin embargo, se sabe que en la presentación de estas enfermedades se conjugan una serie de factores y agentes patógenos, por lo que se llama complejo respiratorio bovino (CRB).¹⁻⁴

El CRB en el corral de engorda constituye una de las principales causas de pérdidas económicas,¹⁻⁵ tan sólo en Estados Unidos de América se han estimado pérdidas anuales por 640 millones de dólares.⁶ Este complejo respiratorio se caracteriza clínicamente por fiebre, disnea, descarga nasal y evidencia de neumonía mediante la auscultación pulmonar.

Los microorganismos responsables del CRB son virus, bacterias y su interacción virus-bacteria.^{1,7-9} Entre los agentes virales involucrados se encuentran: Herpes virus bovino 1 responsable de la rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB), virus de parainfluenza 3 (VPI3) y virus respiratorio sincicial bovino (VRSB).^{1,3,10,11}

Las infecciones virales del aparato respiratorio se han descrito en diversos países. Se ha registrado RIB en Canadá, Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Australia, Gran Bretaña, Sudáfrica y Europa.^{12,13} En México se ha identificado presencia del virus en diferentes partes de la República,^{14,15} y exámenes serológicos demuestran una prevalencia del 16% al 70% en ganado de carne.^{1,16} La infección por el virus PI3 presenta una distribución mundial.¹⁷ Estudios serológicos en México indican que la infección por este virus se encuentra ampliamente difundida en los bovinos del país, con 16% al 86% de animales seropositivos.^{1,18} El VRSB ha sido aislado en la mayoría de los países europeos, en América, Australia, Japón y el norte de África.¹⁷ En México las pruebas serológicas demuestran la existencia de anticuerpos contra este virus en bovinos de engorda y lecheros con prevalencias del 19% al 78%.^{16,19,20}

Se ha documentado la participación de los agentes mencionados en infecciones respiratorias de los bovinos en México; sin embargo, no se dispone de información sobre estas patologías en los centros de producción.

El objetivo de este estudio fue describir las lesiones y determinar la frecuencia de agentes virales en las afecciones respiratorias de bovinos en el corral de engorda.

Material and methods

The study was carried out during 1995 in an extensive feedlot farm with a total capacity of 8 000 cattle located in Culiacan, in the state of Sinaloa, Mexico. The ranch is at 24°48' north latitude and 107°23' longitude, at 60 m above sea level, in a semidry climate type BS1(h').²¹

The cattle consisted of Zebu breed crosses, and, in a lower proportion, *Bos taurus* and Creole crosses. Upon reception, the cattle were bathed against ticks. On average 250 animals were kept in each corral. When initiating the finishing process, the cattle were given bacterins against anthrax and malignant edema, and, to avoid BRC, *one shot* (a bacterin containing *Mannheimia haemolytica* A1 toxin), as well as vitamins A, D and E, deworming, implanting and hot iron branding.

During the study, 292 animals died from respiratory disease. Of these, 176 were necropsied and samples were collected from all cadavers that did not exhibit autolytic changes. Samples were taken from the pneumonic lungs of 48 cadavers and 12 portions of trachea with inflammatory alterations, all of which were described grossly and classified.

Both for histopathology and immunohistochemistry (IHC), samples were fixed in 10% buffered formaldehyde for 48 h, paraffin-embedded and processed for routine hematoxylin-eosin staining.²² Samples were also collected for bacteriological analysis.

For the identification of viral antigens by IHC, 24 lung samples that presented bronchitis, bronchiolitis and syncytial cells in the air spaces, lesions compatible with PI3 and RSV virus, as well as 12 tracheal sections with mononuclear inflammatory response and necrosis of tracheal epithelium, changes compatible with IBR, were selected. Samples were fixed in 10% formaldehyde and paraffin-embedded. Later they were treated with trypsin to unveil antigens and then exposed to conjugated monoclonal antibodies with the avidin-biotin peroxidase complex. A 1/20 dilution was used to identify viral antigens for PI3 and BRSV, while for IBR antigens the dilution was 1/10. In all cases, control samples were used, and these were exposed to normal serum;²³⁻²⁶ positive samples for each of the three types of virus were also used.

Monoclonal antibodies that were obtained from a calf in the Central Veterinary Laboratory in Weybridge, and a commercial kit* that used diamine-benzidine as a chromogen, were used.

To determine seroconversion to PI3 virus, paired samples from 57 animals with clinical respiratory signs were used. The first sample was taken during the acute phase of the process and the second was

Material y métodos

El estudio se realizó durante 1995 en una explotación de engorda intensiva en corral, con una capacidad de ochomil bovinos, ubicada en Culiacán, Sinaloa, México. Se localiza a 24°48' latitud norte y 107°23' de longitud, a 60 msnm, bajo un clima semiseco muy cálido y cálido BS1(h').²¹

El ganado que se engorda son encastes de razas cebuinas y, en menor proporción, encastados con *Bos taurus* y criollos. Al recibirlo, el ganado se baña para el control de garrapatas. En promedio se manejaban 250 animales por lote y corral. Al inicio de la engorda se aplicaba bacterina a los animales contra carbón sintomático y edema maligno, para prevenir el CRB se aplicaba *one shot* (bacterina con toxoide de *Pasteurella haemolytica* A1), se administraban vitaminas A, D y E, se desparasitaba internamente, se implantaban y marcaban con hierro candente.

En el periodo de estudio murieron 292 animales por enfermedad respiratoria, de los cuales se realizaron 176 necropsias y se colectaron muestras de los cadáveres que no mostraron cambios autolíticos. Se colectaron muestras de pulmones neumónicos de 48 cadáveres y 12 porciones de tráquea con alteración inflamatoria, para proceder a la descripción macroscópica de las lesiones y a su clasificación posterior.

Para el examen histopatológico y de inmunohistoquímica (IHQ), las mismas muestras se fijaron en formalina amortiguada al 10% durante 48 h, posteriormente fueron incluidas en parafina y procesadas por la técnica histológica de rutina con tinción de hematoxilina y eosina.²² Se colectaron también muestras para análisis bacteriológico.

Para la identificación de antígenos virales por IHQ, se seleccionaron 24 muestras de pulmón que presentaron bronquitis, bronquiolitis y células sincitiales en espacios aéreos, lesiones compatibles con los virus de PI3 y RSB, así como 12 porciones de tráquea con una respuesta inflamatoria mononuclear y necrosis del epitelio traqueal, cambios compatibles con los producidos por el virus de RIB. Las muestras se fijaron en formalina al 10% y se incluyeron en parafina; posteriormente fueron tratados con tripsina para desenmascarar antígenos y expuestos a anticuerpos monoclonales conjugados con el complejo avidina-biotina peroxidasa. La dilución empleada para identificar antígenos virales de PI3 y RSB fue de 1/20, mientras que la dilución para el virus de la RIB fue de 1/10; en todos los casos se utilizaron muestras testigo que fueron expuestas a suero normal,²³⁻²⁶ así como testigos positivos para cada uno de los tres tipos de virus.

Se emplearon anticuerpos monoclonales obtenidos en ternero en el Central Veterinary Laboratory, Weybridge, y un kit comercial,* que utilizó a la diamino-bencidina como cromógeno.

* Vecastain Elite ABC KIT, Vector Laboratoires, California, USA.

taken two weeks later.¹² These were processed using an ELISA²⁶ that employed commercial conjugates. Samples were considered positive when titers were greater than two double dilutions between the first and second sample.

Results

Gross classification of pneumonias

Of the 48 lungs studies, all presented bilateral pneumonic lesions with a craneoventral distribution and the following morphological diagnoses: 25 lungs (52.08%) severe craneoventral fibrinous pleuropneumonia (Figure 1); 11 (22.92%) severe craneoventral suppurative bronchopneumonia; nine (18.75%) severe craneoventral interstitial pneumonia (fibrinous pleuropneumonia and bronchopneumonia); and three (6.25%) pulmonary abscessation (Table 1).

Microscopic classification of pneumonias

Microscopically, 24 (50%) of the lungs were classified as fibrinous pleuropneumonia (Figure 2); nine (18.75%) as bronchointerstitial pneumonia; six (12.5%) as severe diffuse suppurative bronchopneumonia (Figure 3); five (10.42%) as lymphoproliferative pneumonia; three (6.25%) as pulmonary abscessation; and one (2.08%) as fibrinous pleuritis with hemorrhagic pneumonia (Table 2).

The fibrinous pleuropneumonia was characterized by a moderate to severe deposition of fibrin

Para determinar seroconversión al virus P13, se tomaron muestras pareadas de 57 animales con cuadro clínico respiratorio. La primera muestra se tomó en la fase aguda del proceso y la siguiente dos semanas después.¹² Se procesaron mediante la técnica de ELISA²⁶ utilizando conjugados comerciales. Las muestras se consideraron positivas cuando los títulos fueron mayores de dos diluciones dobles entre la primera y segunda muestras.

Resultados

Clasificación macroscópica de las neumonías

De los 48 pulmones estudiados, todos presentaron lesiones bilaterales y una neumonía con distribución craneoventral con los siguientes diagnósticos morfológicos: 25 pulmones (52.08%) pleuroneumonía fibrinosa craneoventral severa (Figura 1); 11 (22.92%) bronconeumonía supurativa craneoventral severa; nueve (18.75%), neumonía intersticial craneoventral severa (pleuroneumonía fibrinosa y bronconeumonía), y tres (6.25%), neumonía abcedativa (Cuadro 1).

Clasificación microscópica de las neumonías

Microscópicamente, 24 (50%) pulmones se clasificaron como pleuroneumonía fibrinosa (Figura 2); nueve (18.75%) como neumonía broncointersticial; seis (12.5%) como bronconeumonía supurativa severa difusa (Figura 3); cinco (10.42%) como neumonía linfoproliferativa; tres (6.25%) como neumonía abcedativa; y uno



Figura 1. Pulmón de bovino con bronconeumonía fibrinosa. Observándose fibrina sobre la pleura en la región craneoventral pulmonar (flecha). Bovine lung with fibrinous bronchopneumonia. Fibrin can be observed over the pleura in the craneoventral lung region (arrow).

Cuadro 1
CLASIFICACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS NEUMONÍAS EN BOVINOS DE CULIACÁN, SINALOA
GROSS CLASSIFICATION OF BOVINE PNEUMONIA IN CULIACÁN, SINALOA

<i>Type of pneumonia</i>	<i>Frequency</i>	<i>%</i>
Fibrinous pleuropneumonia*	25	52.08
Suppurative bronchopneumonia*	11	22.92
Interstitial pneumonia*	9	18.75
Multifocal pulmonary abscessation	3	6.25
Total	48	100.00

*Severe diffuse.

both in the visceral pleura and the interlobular septa, accompanied by edema. There were moderate quantities of macrophages and neutrophils in the alveoli and bronchioles. In the cases with bronchointerstitial pneumonia one could appreciate moderate quantities of macrophages and neutrophils in bronchi and bronchioles accompanied by moderate edema and fibrin deposition in the interlobular spaces.

In the suppurative bronchopneumonias a moderate to severe quantity of neutrophils and some macrophages were seen in bronchi and bronchioles accompanied by bronchial epithelium necrosis. The adjacent alveoli were full of neutrophils. The cases of lymphoproliferative pneumonia were characterized by discrete to moderate infiltration of lymphocytes

(2.08%) como pleuritis fibrinosa y neumonía hemorrágica (Cuadro 2).

La pleuroneumonía fibrinosa estuvo caracterizada por un depósito moderado a severo de fibrina tanto en la pleura visceral como en los septos interlobulillares, acompañados de edema. Se observaron moderadas cantidades de macrófagos y neutrófilos en los alvéolos y en los bronquiolos. En la neumonía broncointersticial se apreciaron macrófagos y neutrófilos en moderada presencia en los bronquios y bronquiolos, acompañados de deposición moderada de edema y fibrina en espacios interlobulillares.

En las bronconeumonías supurativas se detectó moderada a severa presencia de neutrófilos y algunos macrófagos en bronquios y bronquiolos, acompañada de necrosis del epitelio bronquial. Los alvéolos adyacentes también se encontraban pletóricos de neutrófi-

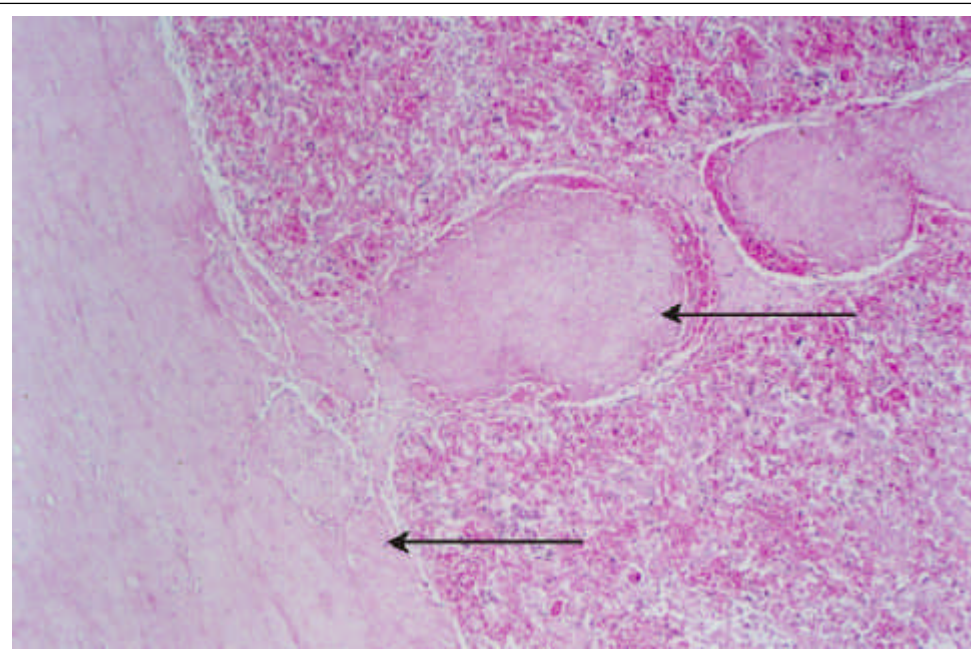


Figura 2. Neumonía fibrinosa. Septo interlobulillar distendido por fibrina y trombos fibrinosos en vasos linfáticos (flechas). H.E. 100x.

Fibrinous pneumonia. Interlobular septum is distended by fibrin and fibrinous thrombi in the lymphatic vessels (arrow).

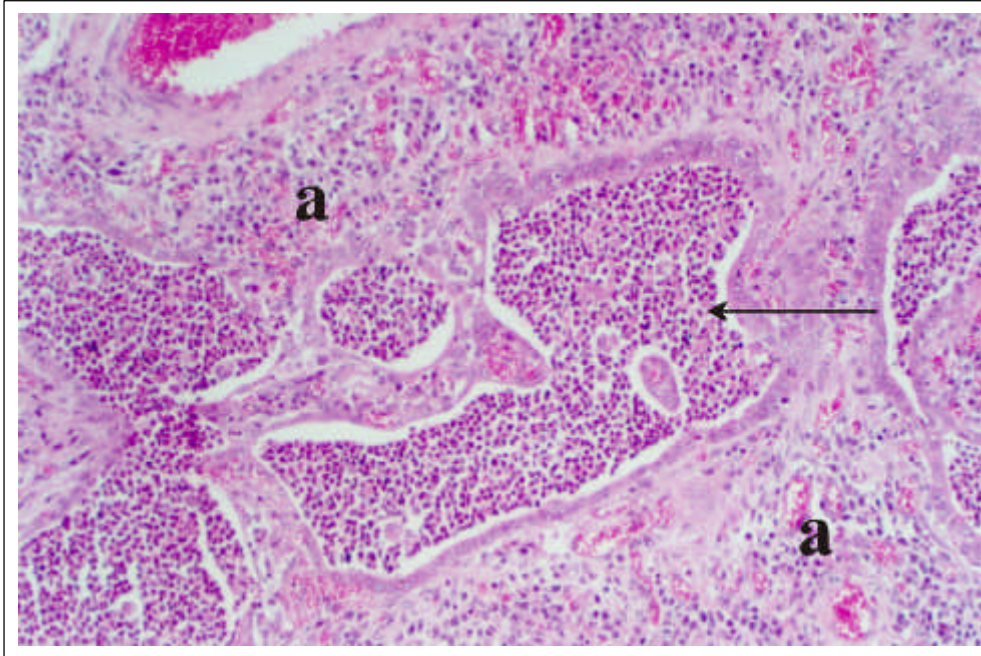


Figura 3. Bronconeumonía supurativa. Presencia de exudado purulento en luz bronquiolar (flecha) y alveolar (a). H.E. 100x. Suppurative bronchopneumonia. Purulent exudate can be seen in the bronchiolar (arrow) and alveolar (a) lumen. H.E. 100x.

Cuadro 2
CLASIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS NEUMONÍAS EN BOVINOS DE CULIACÁN, SINALOA
MICROSCOPIC CLASSIFICATION OF BOVINE PNEUMONIA IN CULIACÁN, SINALOA

Type of pneumonia	Frequency	%
Fibrinous pleuropneumonia*	24	50.0
Interstitial bronchopneumonia*	9	18.75
Suppurative bronchopneumonia*	6	12.5
Lymphoproliferative pneumonia*	5	10.42
Multifocal pulmonary abscessation	3	6.25
Fibrinous pleuritis and hemorrhagic pneumonia*	1	2.08
Total	48	100.00

* Severe diffuse.

and some plasma cells in peribronchial, peribronchiolar and perivascular regions, as well as edema and fibrin with some lymphocytes and macrophages in alveolar spaces, and in the bronchial and bronchiolar lumen.

The cases of pulmonary abscessation presented multiple well-defined abscesses in the lung tissue, accompanied by discrete to moderate infiltration of neutrophils in the alveoli. The cases of fibrinous pleuritis and hemorrhagic pneumonia presented moderate fibrin deposition with some macrophages and neutrophils in the pleura, as well as multiple moderate hemorrhagic zones in lung tissue, respectively.

los. Los casos de neumonía linfoproliferativa se caracterizaron por infiltración discreta a moderada de linfocitos y algunas células plasmáticas en localización peribronquial, peribronquiolar y perivascular, así como edema y fibrina con algunos linfocitos y macrófagos en espacios alveolares y lumen bronquial y bronquiolar.

Los casos de neumonía abscedativa presentaron múltiples abscesos bien definidos en el tejido pulmonar, acompañados de infiltración discreta a moderada de neutrófilos en los alvéolos. Los casos de pleuritis fibrinosa y de neumonía hemorrágica, presentaron moderada deposición de fibrina con algunos neutrófilos y macrófagos en la pleura, así como múltiples zonas



Other histological alterations of importance that were identified in the lungs studied, were: presence of syncytial cells in 24 (Figure 4); peribronchial lymphoid hyperplasia in 15; alveolar epithelial proliferation in 28; and fibroplasia in 33 (Table 3).

Gross and microscopic classification of tracheal lesions

With regards to tracheal lesions, ten were grossly classified as necrotic tracheitis and two as hemorrhagic tracheitis. Microscopically, ten were classified as severe diffuse necrotic tracheitis with non-suppurative infiltrate, one as moderate to severe chronic non-suppurative tracheitis with squamous metaplasia, and one as squamous metaplasia. Necrotic tracheitis presented total tracheal epithelium necrosis with abundant necrotic tissue, some neutrophils and abundant macrophages. In one case, apart from the changes already described, moderate squamous metaplasia of the tracheal epithelium was observed; while in another case, there was squamous tracheal metaplasia.

IHC identification of viral antigens in lung and tracheal tissue

Moderate intracytoplasmic immunopositivity (++) to PI3 virus (Figure 5) in 16 lungs (66.66%), as well as moderate intracytoplasmic (++) to BRSV (Figure 6) in 13 lungs (54.16%), and moderate to strong intranuclear and intracytoplasmic immunopositivity

hemorrhagic moderate in the lung tissue, respectively.

Otras alteraciones histológicas de importancia identificadas en los pulmones estudiados fueron: Presencia de células sincitiales en 24 (Figura 4); hiperplasia linfoides de peribronquial en 15; proliferación epitelial alveolar en 28; y fibroplasia en 33 (Cuadro 3).

Clasificación macroscópica y microscópica de las lesiones traqueales

Respecto de las lesiones traqueales, macroscópicamente diez se clasificaron como traqueítis necrótica y dos como traqueítis hemorrágica. Microscópicamente, diez se clasificaron como traqueítis necrótica severa difusa con infiltración no supurativa, una como traqueítis no supurativa severa moderada, crónica con metaplasia escamosa y una con metaplasia escamosa. La traqueítis necrótica presentó destrucción total del epitelio traqueal con presencia abundante de material necrótico con algunos neutrófilos y abundantes macrófagos. En un caso, además de los cambios descritos, se observó metaplasia escamosa moderada del epitelio traqueal; y en otro caso, metaplasia escamosa traqueal.

Identificación por IHQ de antígenos virales en tejido pulmonar y traqueal

Se encontró inmunopositividad intracitoplásmica moderada (++) al virus PI3 (Figura 5) en 16 pulmones (66.66%); para el VRSB también intracitoplásmica moderada (++) (Figura 6) en 13 pulmones (54.16%), y para

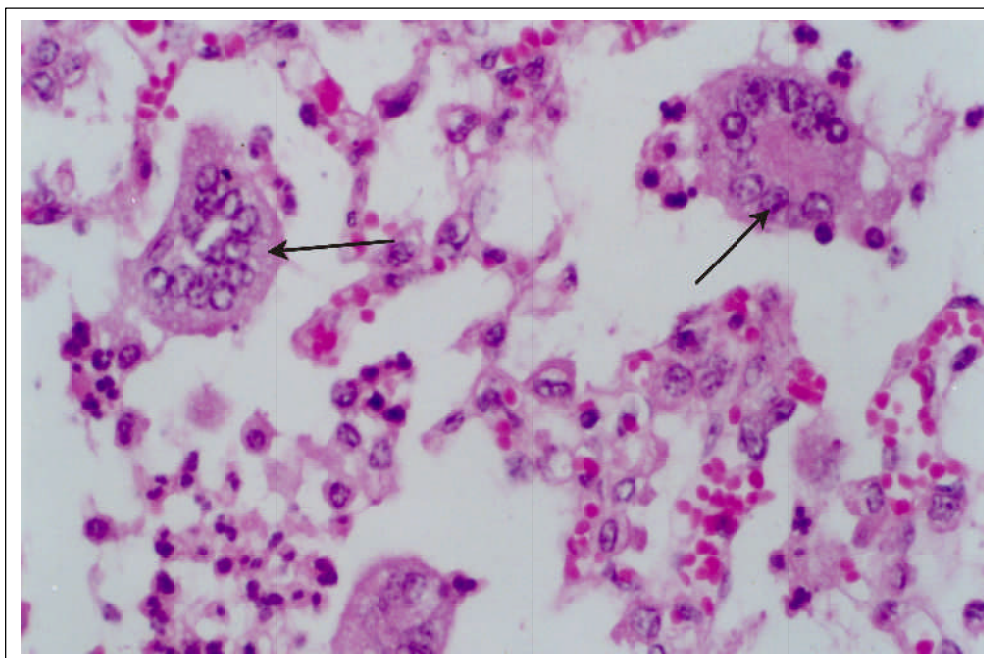


Figura 4. Pulmón. Presencia de células sincitiales en luz alveolar (flechas). H.E. 100x.
Lung. Syncytial cells in alveolar lumen (arrows). H.E. 100x.



Cuadro 3

TIPO DE NEUMONÍA Y FRECUENCIA EN LA PRESENTACIÓN DE CÉLULAS SINCICIALES, HIPERPLASIA LINFOIDE PERIBRONQUIAL, PROLIFERACIÓN EPITELIAL ALVEOLAR Y FIBROPLASIA
TYPE OF PNEUMONIA AND FREQUENCY OF PRESENTATION OF SYNCYTIAL CELLS, PERIBRONCHIAL LYMPHOID HYPERPLASIA, ALVEOLAR EPITHELIAL PROLIFERATION AND FIBROPLASIA

Type of pneumonia	Syncytial cells	Peribronchiolar lymphoid hyperplasia	Alveolar epithelial proliferation	Fibroplasia
Fibrous pleuropneumonia (24)	7	4	17	18
Suppurative bronchopneumonia (6)	6	1	2	5
Lymphoproliferative pneumonia (5)	2	5	3	4
Bronchointerstitial pneumonia (9)	7	4	4	3
Pulmonary abscessation (3)	2	1	2	3
Fibrinous pleuritis and hemorrhagic pneumonia (1)	0	0	0	0
Total	24	15	28	33

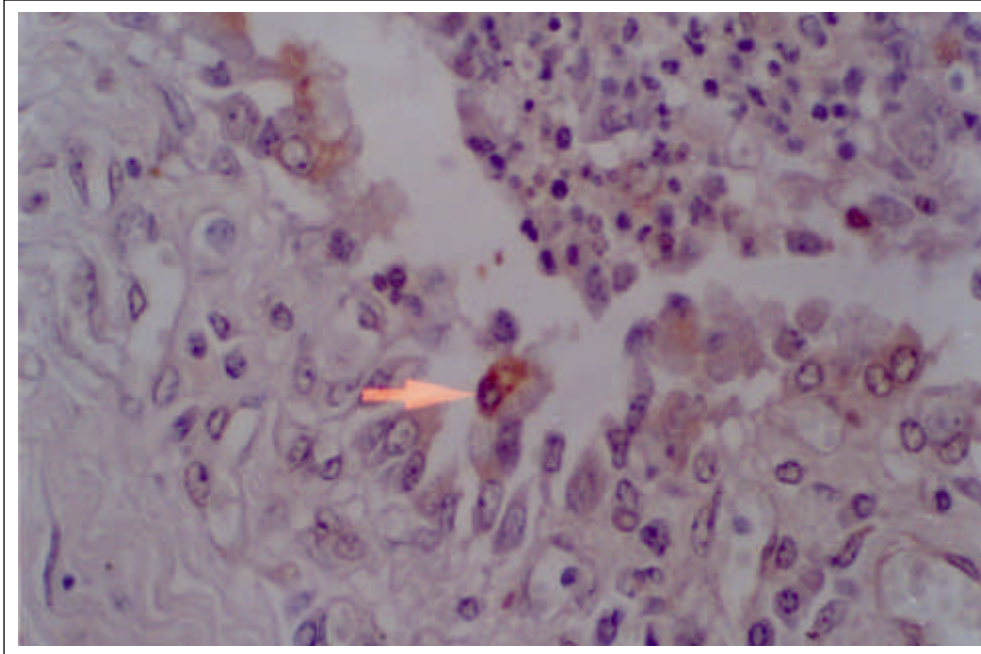


Figura 5. Pulmón. Presencia de inmunopositividad en VPI3 en célula epitelial de bronquiolo (flecha). Inmunoperoxidasa 400x.
Lung. Immunopositivity to PI3 virus in bronchiole epithelial cell. Immunoperoxidase. 400x.

(++/+++), to IRB virus in four tracheas (33.3%), was found.

In ten lung samples immunopositivity to viral antigens was detected in the same location for both PI3 and BRSV (++) in three cases there was immunopositivity to antigens for both PI3 in lung (++) and IBR in trachea (++) in three cases there was immunopositivity to antigens for both PI3 in lung (++) and IBR in trachea (+++). One case presented antigens to BRSV in lung (++) and IBR in trachea (+++). Finally, there was one case of immunopositivity in viral antigens to PI3 and BRSV in lung (++) and IBR in trachea (+++).

el virus RIB intranuclear e intracitoplásmica de moderada a fuerte (++/+++), en cuatro tráqueas (33.3%).

En diez muestras de pulmón se detectó inmunopositivity a antígenos virales con la misma localización para PI3 y RSB (++) en tres casos se observó inmunopositivity a antígenos del VPI3 en pulmón (++) y en tráquea del RIB (+++); en un caso a antígenos del VRSB en pulmón (++) y en tráquea del RIB (+++); de la misma forma, en un caso se detectó en pulmón, inmunopositivity a antígenos de los virus PI3 y RSB (++) y en tráquea del RIB (+++).



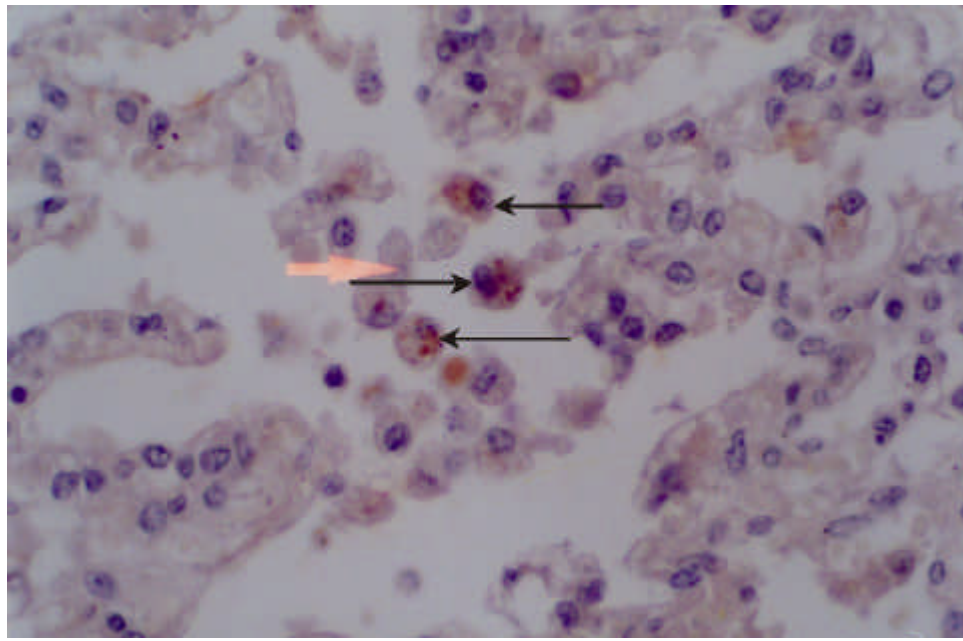


Figura 6. Pulmón. Presencia de inmunoposividad a VRSB en citoplasma de macrófagos alveolares (flechas). Inmunoperoxidasa. 400x.
Lung. Immunopositivity to BRSV in cytoplasm of alveolar macrophages. Immunoperoxidase. 400x.

Relationship between lung and trachea containing viral antigen via IHC with type of lung lesion

Of those lungs that were immunopositive to PI3: seven (43.75%) had fibrinous pleuropneumonia; two (12.5%) had bronchopneumonia; six (37.5%) had bronchointerstitial pneumonia; and one (6.25%) had pulmonary abscessation. Of those immunopositive to BRSV: five (38.46%) had fibrinous pleuropneumonia; three (23.08%) had bronchopneumonia; three (23.08%) had bronchointerstitial pneumonia; and two (15.28%) had pulmonary abscessation (Table 4). Of the four tracheas that were immunopositive to IBR virus: one (25%) had fibrinous pleuropneumonia; one (25%) had bronchopneumonia; one (25%) had bronchointerstitial

Relación de pulmones y tráqueas que mostraron antígeno viral por IHQ con el tipo de lesión pulmonar

Fueron inmunopositivos al VPI3: Siete (43.75%) pulmones con pleuroneumonía fibrinosa; dos (12.5%) con bronconeumonía, seis (37.5%) con neumonía broncointersticial y uno (6.25%) con neumonía abscedativa. Los pulmones inmunopositivos al VRSB fueron: Cinco (38.46%) con pleuroneumonía fibrinosa, tres (23.08%) con bronconeumonía, tres (23.08%) con neumonía broncointersticial y dos (15.28%) con neumonía abscedativa (Cuadro 4). Las cuatro tráqueas inmunopositivas al VRIB se asociaron con: Uno (25%) pleuroneumonía fibrinosa, uno (25%) bronconeumonía, uno (25%) neumonía broncointersticial, y uno (25%) con neumonía linfoproliferativa.

Cuadro 4

RELACIÓN DE PULMONES QUE MOSTRARON INMUNOPOSITIVIDAD A LOS ANTÍGENOS VIRALES DE PI3 Y RSB, Y TRÁQUEAS DE RIB POR IHQ CON EL TIPO DE LESIÓN PULMONAR
LUNG THAT WERE IMMUNOPOSITIVE TO VIRAL ANTIGENS PI3 AND BRSV, AS WELL AS TRACHEAL IBR ANTIGENS USING IMMUNOHISTOCHEMISTRY ACCORDING TO TYPE OF PNEUMONOMIC LESION

<i>Antigen and frequency</i>	<i>Fibrinous pleuropneumonia</i>	<i>Suppurative bronchopneumonia</i>	<i>Bronchointerstitial pneumonia</i>	<i>Pulmonary abscessation</i>	<i>Lymphoproliferative pneumonia</i>
PI3V (16)	7 (43.75)	2 (12.5%)	6 (37.5%)	1 (6.25)	
BRSV (13)	5 (38.46%)	3 (23.08%)	3 (23.08%)	2 (15.38%)	
IBRV (4)	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)		1 (25%)

pneumonia; and one (25 %) had lymphoproliferative pneumonia.

Serology

Of the 57 paired samples, seroconversion was found in 12 (21 %) for PI3 virus.

Bacteriology

No bacteria known to be important in bovine pneumonias were isolated.

Discussion

The gross and microscopic lesions found were similar to those described for the agents that are frequently isolated in pneumonic lungs of bovines.^{9,27-29}

One important finding was that of syncytial cells in alveolar spaces of half the lungs studied. The formation of these cells, due to the fusion of epithelial cells, is characteristic for PI3 and BRSV infections,^{9,20} indicating the participation of these viruses in the pneumonias analyzed in this study.

Infectious bovine rhinotracheitis infection is characterized by necrosis of the tracheal epithelium, mononuclear inflammatory exudate in the submucosa during the acute phase of infection, and the appearance of intranuclear eosinophilic inclusion bodies.^{9,28} With the exception of the inclusions, the rest of the lesions were observed in the tracheas studied, and can thus be associated to infection with this virus.

The absence of inclusion bodies in lungs and tracheas from this study may be due to the fact that animals did not die in the acute phase of infection, which is when said inclusions can be observed.⁹

The antigens identified in the lung using IHC were observed in the cytoplasm of alveolar and interstitial macrophages, in the cytoplasm of bronchial epithelial cells and, in one case, in the cytoplasm of a syncytial cell. In the tracheas they were observed in the cytoplasm of submucosal glandular epithelial cells, in the cytoplasm of interstitial macrophages, and, in one case, in the nucleus of the cells in the tracheal epithelium. The sites of immunopositivity correspond to those described by various authors,²⁹⁻³² and confirm, though the use of specific antibodies, the presence of IBR, PI3 and BRSV. Negative samples could be due to: animals presenting pneumonia spontaneously without full knowledge of the evolution of their clinical presentation; however, a study by Woolums *et al.*³² detected BRSV antigen in the lung of only six of 12 experimentally-

Análisis serológico

De las 57 muestras de suero pareadas, se determinó seroconversión en 12 (21 %) para el virus de PI3.

Análisis bacteriológico

No se aislaron bacterias de importancia reconocida en las neumonías de bovinos.

Discusión

El tipo de lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas son similares a las descritas para los agentes que con frecuencia se aíslan de pulmones con neumonía en bovinos.^{9,27-29}

Un hallazgo importante fue la presencia de células sinciciales en espacios alveolares de la mitad de los pulmones. La formación de estas células, debidas a la fusión de células del epitelio pulmonar, representa una característica de las infecciones de los virus de PI3 y RSB,^{9,20} lo que indica en este estudio participación de estos virus en las neumonías.

La infección del virus de la RIB se caracteriza por producir necrosis del epitelio traqueal, un exudado inflamatorio mononuclear en la submucosa y en la etapa aguda de la infección; es posible observar cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares,^{9,28} con excepción de las inclusiones el resto de las lesiones fueron observadas en las tráqueas estudiadas y pueden asociarse con la infección por este virus.

La ausencia de cuerpos de inclusión de los virus respiratorios en los pulmones y tráqueas revisadas posiblemente se deba a que los animales no murieron en la fase aguda de la infección, que es cuando se pueden observar dichas inclusiones.⁹

Los antígenos identificados en pulmón por IHQ se observaron en el citoplasma de macrófagos alveolares e intersticiales, en el citoplasma de células del epitelio bronquial y en un caso en el citoplasma de una célula sincicial. En las tráqueas se observó en el citoplasma de células del epitelio glandular en la submucosa, en el citoplasma de macrófagos intersticiales y en un solo caso en el núcleo de células del epitelio traqueal; los sitios donde se observó inmunoposividad corresponden a lo informado por diversos autores,²⁹⁻³² y confirmó a través del anticuerpo específico presencia de los virus RIB, PI3 y RSB. Las muestras que fueron negativas a la prueba probablemente puedan deberse a aspectos como los siguientes: Los animales presentaron de manera espontánea la neumonía y se desconoce la evolución del cuadro clínico de cada animal; sin embargo, en el estudio de Woolums *et al.*³² sólo se detectó el antígeno del VRSB en el pulmón de seis de 12 becerros inoculados experimentalmente con dicho virus y sacrificados diez días posinoculación, lo que indica que el antígeno

infected calves which were euthanized ten days postinoculation, thus indicating that viral antigen is not detected in all processed tissues. It is worth mentioning that lungs subjected to IHC presented lesions suggestive of viral infection and that 19 of 24 showed differing degrees of fibroplasia, indicating a tendency towards chronicity. If one considers, as has been reported previously, that the lungs of animals experimentally infected with PI3 virus or BRSV are more susceptible to secondary bacterial infections on the sixth and tenth day postinoculation,⁹ and if one adds to this the time transpired (unknown in these cases) for the lungs to be damaged by opportunistic agents until evidence of repair is presented, then the total time is considerably longer and could be influencing the lack of antigen detection.

Other possible reasons could be found in the limits presented by IHC. It has been mentioned previously that fixatives could denature proteins and mask the antigenic determinants, thus causing a weak or scant response.³³ Another possibility is excessive fixing of the tissue that causes a loss of intracytoplasmic antigens. In a similar vein, paraffin-embedded tissues could present alterations in the antigens present in the cell's cytoplasm, a high concentration of primary antibody can give false negative results, and repeated thawing can also alter results.³⁴ These limitations might have influenced the results of this study. In this context, finding IBR,^{1,14-16} PI3^{1,18} and BRSV^{16,19,20} viral antigens in pneumonic lung tissue confirms their participation in bovine respiratory disease.

Serology demonstrated the participation of PI3 virus in pneumonia; this finding confirms the participation of this virus in bovine pneumonias in Mexico.^{1,16}

The fact that no bacterial isolation of *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* or *Haemophilus somnus* was possible in this study, is attributed to the high doses of antibiotics that were administered to those cattle that began showing respiratory signs.

The results of this study allow us to conclude that exudative pneumonias predominated, and that among these fibrinous interstitial pneumonia was the most common. Infectious bovine respiratory virus, parainfluenza 3 virus and bovine respiratory syncytial virus were all present and were responsible for the diseases studied; PI3 was the most frequent.

Referencias

1. Trigo FJ. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Cienc Vet* 1987;4:1-36.
2. Durham JK, Hassard LE. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine

viral puede no detectarse en la totalidad de los tejidos procesados. Es pertinente mencionar que los pulmones sometidos a la IHQ presentaron lesiones sugestivas a infección viral y donde 19 de 24 mostraron fibroplasia en diferentes grados, lo que hace suponer una tendencia hacia la cronicidad de la neumonía. Si se considera, como se ha informado en la literatura, que el pulmón de animales experimentalmente infectados con virus PI3 y RSB, son más susceptibles a las infecciones bacterianas secundarias al sexto y décimo días posinoculación,⁹ y si a ello se le suma el tiempo transcurrido (que para estos casos es desconocido) para que el pulmón sea dañado por los agentes oportunistas hasta presentar evidencias de reparación, entonces el tiempo es considerablemente mayor y podría estar influyendo para no detectar antígenos.

Otras posibles razones se pueden encontrar en las limitantes que presenta la prueba de IHQ. Se ha mencionado que los fijadores pueden desnaturalizar proteínas o enmascarar los determinantes antigénicos y ocasionar que la respuesta sea débil o escasa,³³ o bien la sobrefijación del tejido provoca una pérdida de antígenos intracitoplásmicos, así también los tejidos incluidos en parafina pueden presentar alteración de los antígenos que se encuentran en el citoplasma de la célula, una concentración alta del anticuerpo primario puede dar casos falsos negativos, o si éste fue descongelado más de una vez también altera los resultados.³⁴ Estas limitantes posiblemente influyeron en los resultados de este estudio. En este contexto, el hallazgo de estos antígenos virales en el tejido pulmonar con neumonía confirma su participación en las enfermedades respiratorias de los bovinos: RIB,^{1,14-16} PI3^{1,18} y VRSB.^{16,19,20}

En el análisis serológico se determinó la participación del virus de PI3 en la presentación de cuadros neumónicos; este hallazgo confirma la participación de este virus en las neumonías de los bovinos en México.^{1,16}

El hecho de no haber aislado bacterias como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* o *Haemophilus somnus* en el presente estudio, se atribuyó a los antibióticos que se les administraban en dosis altas a los bovinos que empezaban a mostrar semiótica respiratoria.

Los resultados de este estudio permiten concluir que las neumonías exudativas fueron predominantes, entre ellas la neumonía intersticial fibrinosa fue la más frecuente. Los virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, de la parainfluenza tipo 3 y el virus respiratorio sincicial bovino, estuvieron presentes y fueron responsables de las enfermedades estudiadas, el virus de PI3 fue el más frecuente.

respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. *Can Vet J* 1990;31:815-820.

3. Durham JK, Hassard LE, Donkersgoed JV. Serological studies of infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine viral diarrhoea, and bovine respiratory syn-

- cytial viruses in calves following entry to a bull test station. *Can Vet J* 1991;32:427-429.
4. Healy AM, Monaghan ML, Bassett HF, Gunn HM, Markey BK, Collins JD. Mobidity and mortality in large Irish feedlot; microbiological and serological findings in cattle with acute respiratory disease. *Br Vet J* 1993;149:549-560.
 5. Galyean ML, Perino LJ, Duff GC. Interaction of cattle health, immunity and nutrition. *J Anim Sci* 1999;77:1120-1134.
 6. Bowland SL, Shewen PE. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Can Vet J* 2000;41:33-48.
 7. Hjerpe CA. Clinical management of respiratory disease in feedlot cattle. Symposium on herd health management; cow-calf and feedlot. *Vet Clin of North Am (Large Anim Pract)* 1983;5:119-142.
 8. Frank GH. The role of *Pasteurella haemolytica* in bovine respiratory disease complex. *Vet Med* 1986;81:838-846.
 9. Trigo FJ. Patología sistémica veterinaria. 3ª. ed. México, D.F.: McGraw-Hill-Interamericana, 1998.
 10. Thomas LH. Respiratory diseases of cattle. *Curr Top Vet Med* 1978;3:57-65.
 11. Trigo FJ. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurellosis pulmonar bovina. *Vet Mex* 1991;2:131-135.
 12. Correa GP. Rinotraqueítis infecciosa de los bovinos. *Cienc Vet* 1976;1:131-161.
 13. Blood DC, Henderson SA, Radostits DM. Medicina veterinaria. 6ª ed. Mexico, D.F.: Nueva Editorial Interamericana, 1988.
 14. Correa GP, Brown LN. Anticuerpos neutralizantes de los virus de la rinotraqueítis infecciosa y de la diarrea viral bovina; anticuerpos fijadores del complemento contra *Haemophilus sommus* en sueros del D.F. y Yucatán. Memorias de la X Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias; 1973 febrero 16; México (DF). México (DF): Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, 1973: s/p
 15. López A. Septicemia hemorrágica. *Vet Mex* 1977;8:111-116.
 16. Barajas RJA, Rodríguez RD. Seroepidemiología de enfermedades infecciosas en ganado bovino del municipio de Tamiahua, Veracruz. Memorias del XX Congreso Nacional de Buiatría; 1996 agosto 16; Acapulco (Guerrero). México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1996: 48
 17. Dinter Z, Morein B. Virus infections of vertebrates. Horzinc M.C., editor. Virus infections of ruminants. Vol 3 Amsterdam, Netherlands Elsevier Science Publishers, 1990.
 18. Barajas RJA. Seroepidemiología de enfermedades infecciosas en ganado bovino en el trópico mexicano. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría; 1995 agosto 24; Torreón (Coahuila) México. México (DF) Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1995. 9-27
 19. Correa P, Gillete KG. Presencia de anticuerpos neutralizantes contra virus respiratorio sincitial en bovinos de México. Memorias de la XV Reunión Anual del Instituto de Investigaciones Pecuarias; 1981 diciembre 5. México (DF). México (DF) Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, 1981: 401-403.
 20. Hernández JP. Biología del virus respiratorio sincitial bovino, clasificación, distribución, patogenia, vacunas, protección y diagnóstico. Memorias del XX Congreso Nacional de Buiatría; 1996 agosto 16; Acapulco (Guerrero). México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1996: 36
 21. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario estadístico del Estado de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa. Gobierno del Estado de Sinaloa, 1994.
 22. Valero G. Diagnóstico veterinario. México, D.F. Sociedad Mexicana de Patólogos, A.C., 1993.
 23. Atanasio P. La réaction de L'immunoperoxidase pour la mise en évidence du virus rabique. Martin MK, Koprowski H, editeurs. La ragé techniques de laboratoire. Genève, Switzerland. Organisation Mondiale de la Santé, 1974.
 24. Gay H, Docherty JJ. Immunoperoxidase detection of viral antigens in cells. In: Specter H, Lancz M.: Clinical virology manual. Amsterdam, Netherlands Elsevier, 1986:147-158.
 25. Katz JB. Detection of bovine virus diarrhoea virus in cell culture using an immunoperoxidase technique. *Vet Microbiol* 1987;13:153-157.
 26. Dinter Z. Diagnostic virology In: Moreno-Lopez J. Diagnostic Virology. FAO, IAEA and SIDA. Uppsala, Sweden, 1989.
 27. Blanco VF, Trigo FJ, Jaramillo ML, Aguilar RF: Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. *Rev Latinoam Microbiol* 1995;37:121-126.
 28. Carlton WW, McGavin MD. Thomson's special veterinary pathology. 2ª ed. St. Louis (Mo): Mosby, 1995.
 29. Dungworth DL. The respiratory system. In: Pathology of Domestic Animals. Jubb KVF, Kennedy PC. And Palmer N. Editors. Academic Press, New York, 3ª ed. 1993.
 30. Haines DM, Clark EG, Chelack BJ. The detection of bovine respiratory syncytial virus in formalin fixed bovine lung with commercially available monoclonal antibodies and avidin biotin complex immunohistochemistry. *Can J Vet Res* 1989;53:366-368.
 31. Ogino H, Inui S, Narita M. Demonstration of infectious bovine rhinotracheitis virus antigen by immunoperoxidase method in tissues of aborted bovine fetuses preserved for 25 years in paraffin blocks. *J Vet Med Sci* 1996;58:459-460.
 32. Woolums AR, Anderson ML, Gunther RA, Schelegle ES, Larochelle DR, Singer RS, et al. Evaluation of severe disease induced by aerosol inoculation of calves with bovine respiratory syncytial virus. *Am J Vet Res* 1999;60:473-480
 33. Vanda CB, Valero EG. Inmunohistoquímica diagnóstica. Memorias del Curso sobre Inmunohistoquímica. 1997 junio 25, México (DF). México (DF): Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, 1997: s/p
 34. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase techniques: a practical approach to tumor diagnosis. Chicago (Ill), American Society of Clinical Pathologists, 1994.