

CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA SOBRE CELULAS, CON MATERIALES DE CASOS CLINICOS

**GOLLAN, A.¹; SILVANO, D.¹; REUTEMANN, S.¹; OCCHI, H.¹;
PINOTTI, M.¹; RODRIGUEZ, R.²; LUCCA, E.³ & PASSEGGI, C.¹**

RESUMEN

Este estudio describe la detección inmunoquímica del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) de cepas recuperadas de casos clínicos del Hospital de Salud Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL. Estas cepas aisladas en los sistemas habituales e identificadas por Inmunofluorescencia directa (IFD) y seroneutralización (SNT) se estudiaron por técnicas inmunoquímicas (IQ-IP) para confirmarlas y establecer una diferenciación de las mismas en los genotipos 1 y 2. Sobre 54 muestras estudiadas 41 fueron positivas en Inmunoquímica-inmuno-peroxidasa (IQ-IP), 7 de las cuales se evidenciaron solo por esta técnica, habiendo sido negativas para aislamiento e inmunofluorescencia.

Todas correspondieron al genotipo 1 y ninguna al genotipo 2.

Palabras claves: genotipos, biotipos, inmunoquímica, diarrea viral bovina.

SUMMARY

Inmuochemical characterization of Bovine Viral Diarrhoea Virus in cells with samples of clinic cases.

This study describe the immunochemical detection of the BVD V (Bovine viral diarrhea virus) of recovered strains from clinics cases submitted to the Faculty of Veterinary Sciences - Animal Health Hospital of the Litoral National University- Santa Fe- Argentina. Strains previously recovered by the clasical systems and identified by direct immunofluorescence (DIF) and seroneutralization test (SNT), were studied and compared its performance with the immunochemical techniques to ensure the confidence of them and make a distinction between genotypes 1 & 2. About 54 samples studied 41 were positive in Immunochemical-Immunoperoxidase (IQ-IP) techniques and 7 were recognized by this method and not by the traditional one (isolation and direct immunofluorescence).

All the strains belongs to type 1 and none to type 2.

Key words: genotype, biotype, immunochemistry, bovine viral diarrhea.

1.- Cátedra de Virología e Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Email: agollan@fcv.unl.edu.ar

2.- Cátedra de Clínica de Grandes Animales. FCV (UNL).

3.- Cátedra de Infectología. FCV (UNL).

Manuscrito recibido el 7 de septiembre de 2006 y aceptado para su publicación el 22 de diciembre de 2006.

INTRODUCCIÓN

El virus de la Diarrea Viral Bovina (V DVB), un ARN de cadena simple perteneciente a la Familia Flaviviridae, que comparte con el virus de la enfermedad de la frontera (Border disease) y Peste Porcina Clásica (PPC), es responsable de enfermedad entérica y fallos reproductivos en bovinos.

Puede pasar verticalmente de madre a feto causando abortos, terneros malformados e individuos que nacen infectados persistentemente (P.I.) (Lértora, 2003).

Presenta 2 genotipos: Tipo 1 -con al menos 11 genogrupos- y Tipo 2. El primero contiene las cepas clásicas y los virus más utilizados en vacunas, mientras el tipo 2 puede causar trombocitopenia y enfermedad aguda.

Ambos genotipos pueden presentarse en 2 biotipos: el no citopatogénico (NCP) y el citopatogénico (CP), en relación a su expresión sobre cultivos celulares in vitro (Deregt & Lowen 1995; Odeón *et al.*, 1999; Saliki *et al.*, 1997). Los virus NCP de ambos genotipos pueden establecer infecciones persistentes en animales susceptibles.

Estos animales persistentemente infectados con cualquiera de los genotipos pueden evolucionar a Enfermedad de las Muco-sas, de curso fatal (Donis, 1995).

La identificación de los P. I. con V DVB - NCP, que no expresan su actividad en los cultivos celulares in vitro, se ha hecho por diferentes métodos que incluyen aislamiento viral (Lee & Gillespie, 1957), inmunofluorescencia (IF) (Dubovi, 1996) inmunoperoxidasa (IP) (Castro *et al.*, 1997; Deregt & Prins 1998; Fray *et al.*, 1998), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Vilceck *et al.*, 1994) y captura de antígenos por enzimoimmunoensayo (ELISA) (Saliki *et al.* 1997).

En todos los casos el uso de anticuerpos

monoclonales ha redituado especificidad a las pruebas realizadas y a causa de la diversidad antigénica del V DVB se han utilizado pools de anticuerpos monoclonales con epitopes conservados para mantener un alto nivel de sensibilidad diagnóstica (Dubovi, 1996). No obstante, la técnica por excelencia para demostrar la implicancia de este agente es el aislamiento directo desde material clínico.

El aislamiento puede intentarse sin mayores dificultades, pero a causa de la existencia de los biotipos NCP la presencia del virus sobre células puede requerir de otras pruebas específicas (Lee & Gillespie, 1957).

Tal detección depende entonces entre otras técnicas, del uso de anticuerpos fluorescentes (F. A.) o más recientemente en uso habitual, de anticuerpos ligados a enzimas (I. P) de diferentes formas (Brodersen *et al.*, 1998; Dubovi, 1998).

La detección de antígenos del V DVB también tiene una gran alternativa en los tests IQ - IP e inmunohistoquímicos, realizándose éstos a partir de tejidos infectados.

Su desempeño es superior en estos casos a la IF, ya que la señal del antígeno se amplifica por acción enzimática (Fray *et al.*, 1998; Haines *et al.*, 1992). Este estudio comunica la caracterización viral de cepas recuperadas de casos clínicos provenientes del Hospital de Salud animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL, que recibe muestras provenientes de la zona de influencia de la misma (en la cuenca lechera santafesina) a través de I.Q., algunas de cuales han sido previamente estudiadas por IFD y SNT (Gollan *et al.*, 2006).

El objetivo de este estudio fue establecer comparaciones entre las técnicas mencionadas y las I.Q. en cuanto a su eficiencia y reproducibilidad, a la confirmar la posibilidad de implementar su disponibilidad como aporte un diagnóstico rápido y fiable y a ti-

pificar los aislamientos en T 1 y T 2. (Deregt *et al.*, 1998 (a)Deregt *et al.*, 1998 (b)).

log 10 de la DICT 50% / ml (dosis infecciosa cultivo de tejido 50% por mililitro) de inóculo empleado.

MATERIALES Y METODOS

- Cepas virales

Se estudiaron 54 materiales, 47 cepas del V DVB – previamente aisladas y caracterizadas como pertenecientes al virus de la Diarrea Viral B ovina- (39 CP y 8 NCP), y 7 muestras provenientes de fetos y órganos de bovino, ingresados desde el Hospital de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL) que resultaron negativos en aislamiento.

El mismo se intentó por medio de las técnicas clásicas : triturados y mortereados con arena estéril de alícuotas de los órganos de interés (bazo-riñón-pulmón y placentas) en minimun essential medium (MEM), filtrados por gasa y algodón se centrifugaron por 45 minutos a 5.000 r.p.m. y luego el sobrenadante filtrado por membranas de 0.2 micras de poro se controlaron bacteriológicamente y se inocularon en monocapas confluentes de cultivos primarios de testículo y pulmón de feto bovino y /o línea celular establecida MDBK (Madin Derby Bovine Kidney).

Las cepas aisladas en nuestro Laboratorio entre los años 2000 y 2004 fueron caracterizadas previamente por las técnicas de IFD con reactivos comerciales (VMRD) y SNT con antisuero policlonal elaborado frente a la cepa CP de referencia Singer, de título seroneutralizante 1:160 (Gollan *et al* 2003). Se procesaron además las cepas de referencia internacional CP: Singer y NADL y NCP: NY 1.

Fueron tituladas por los métodos habituales, calculándose los títulos de las mismas por el método de Reed & Muench expresado como el factor de dilución el cual resultó positivo en el 50% de los cultivos infectados con cada virus, punto expresado como el

- Inmunofluorescencia directa (IFD)

Tanto la detección de la presencia de virus NCP como la identificación de las cepas CP y el control de la línea celular establecida MDBK -usada en los aislamientos y certificada libre del VDVB-, se realizaron por IFD utilizando antisuero policlonal anti V DVB conjugado con fluoresceína, de origen comercial (VMRD -Cat: 210-61-BVD- direct conjugate to fluorescein isothiocyanate), según el método de Coons y cols. (FAO –Red Cooperación Técnica ONU) y las indicaciones del reactivo comercial, siendo el antedicho aplicable a la detección y/o titulación de las cepas de campo del virus en cuestión incluyendo las CP y NCP y a los genotipos 1 y 2 sobre cultivos celulares.

La cepa denominada 333/4 aislamiento de VDVB de nuestro Laboratorio (Gollan *et al.* 2006) obró de control interno en la tipificación en 1 y 2 ya que la misma proveniente de un caso clínico con síndrome hemorrágico -y caracterizada por biología molecular estudiando la secuenciación de la región 5'- ha revelado un 90% y 98% de similitud entre ella y los grupos I a y I b del Tipo I.

- Seroneutralización

Se utilizaron células de cultivos primarios de riñón y pulmón de feto bovino (CP RFB-PFB) y la línea celular establecida MDBK.

En esta instancia se probaron dos líneas celulares para comparar la eficiencia de las mismas: Táquea Bovina (B-Tr) y MDBK eligiéndose esta última por su crecimiento más

rápido, lo que permite montar el test en poco tiempo, siendo tanto o más eficientes que las de traquea para el aislamiento del virus.

Para evitar contaminaciones provenientes del suero fetal bovino con el VDVB se suplementaron los medios de crecimiento celulares con 10 % de suero equino.

La SNT se realizó con el método suero fijo/ virus variable enfrentando distintas diluciones de las cepas virales al antisuero elaborado frente a la cepa de referencia NADL de título 1/128, enfrentándolo a 4 réplicas por dilución, definiendo como neutralización la máxima dilución viral que logró ser neutralizada por el antisuero (Manual Tec. FAO-ONU).

El 48 % (26/54) de los materiales fueron estudiados también en IFD desde improntas de distintos órganos por IFD con el material recientemente necropsiado y frente a conjugados anti V DVB y virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) (Gollan *et al.*, no publicado).

I - Técnicas inmunoquímicas (IQ) sobre células

Los ensayos de IQ se llevaron a cabo con técnicas cedidas en forma directa por el Dr. R. Donis del Dpt. Of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Nebraska-Lincoln- USA- (IPX test -indirect immunoperoxidase staining- Meyling, 1984)

Se prepararon policubetas con células MDBK (obtenidas del ABAC-Asociación Banco Argentino de Células, certificadas libres del V DVB, controladas periódicamente por IFD) y cultivadas para su crecimiento con suero equino, las que fueron inoculadas por duplicado con 0,2 ml de cada cepa viral.

Luego de 48 hs. de incubación (cuando las cepas CP estuvieron en un ECP: efecto citopatogénico que afecta el del 50 % la

mo-nocapa o + +) se fijaron a -20° C por 15 minutos con 100 microlitros / celda de Buffer de Fijación /acetona, dejándose secar al aire a temperatura ambiente toda la noche. Con las cepas NCP se procedió a las 24-48 horas de inoculación.

Fueron agregados 150 micro-litros / celda de una dilución 1:200 de Anti-suero policlonal comercial VMRD: BVDV Cat. -210-70 suspendido en Buffer de ligado, incubándose por 90 minutos a 37° C.

Lavadas 3 veces con Buffer de Lavado, 250 microlitros /celda, se agitaron las policubetas en cada lavado, luego se secaron muy bien. Se adicionaron 75 microlitros /celda de HRP-rec-Protein G (Zymed -cat:10/1223-Protein G HRP conjugate 1 mg/ml) dilución 1:1000 en Buffer de ligado.

La prueba se incubó por 45 minutos a 37° C descartándose luego el contenido líquido, realizándose 4 lavados con 150 micro-litros/ celda con Buffer de Lavado, dejándolas secar sobre papel absorbente.

Finalmente se agregaron 150 microlitros /celda de Solución de Sustrato AEC (3-amino-9-ethylcarbazole- Sigma A 6926) agítándose suavemente para producir el mezclado.

Envueltas en papel de aluminio se incubaron a temperatura ambiente por 60 minutos, al término de los cuales se observó la aparición de color absorbido por las células, prolongándose luego la incubación por espacio de 20 minutos más, para una mejor definición.

Definido el color se descartó el sustrato y se frenó la reacción lavándolas con agua corriente, para dejarlas secar durante toda la noche.

Efectuando la lectura de resultados se valoró la tinción sobre las células infectadas, respecto de aquellas sin inocular (controles normales) y las correspondientes a las cepas de referencia ensayadas, cada vez que se

hicieron las pruebas.

II - Ensayos con anticuerpos monoclonales (AC) -microtécnica- para detección de tipo 1 y tipo 2.

Se procedió con la técnica descripta por Fulton, Deregt y cols (Deregt & Prins, 1998) Immunoperoxidase Microisolation Anti-bodies (IPMA), procesándose idéntica cantidad de aislamientos que en las técnicas IQ descriptas anteriormente y las cepas de referencia NADL, Singer, y NY 1.

Se utilizaron Ac monoclonales para detección del VDVB: - Monoclonal Ab Isotype 2 -IgG 2 a para la Proteína E (gp53) tipo 2 del VDVB - cell line- BA 29- VMRD-

- Monoclonal Ab Isotype Ig2a -Type 1- IgG 2a -cell line 157 -(para IFI e IP) VMRD-

Cada una de las cepas diluidas 10^{-1} en minimun essential medium (MEM) fue depositada en cantidad de 0,025 ml en micro-policubetas a las que se adicionó 0,05 ml de una suspensión celular de línea MDBK en concentración de 500-800.000 células por mililitro a cada celda, con medio de crecimiento con 10 % de suero equino, se cubrieron e incubaron por 5 días a 37°C.

Cada cubeta se preparó por duplicado a fin de estudiar todos los materiales separadamente, frente a cada monoclonal dirigido a cada uno de los tipos.

La observación diaria en microscopio invertido permitió determinar la aparición del efecto citopatogénico (ECP), retirándose al 5° día el medio de cultivo, se fijaron las microcapas con 150 microlitros de acetona

70% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente.

Escurrida la acetona se dejaron secar a temperatura ambiente por 3 horas manteniéndolas a 4°C hasta su tinción.

Rehidratadas las celdas con 200 microlitros de PBS / Tween se agregaron 100 microlitros /celda de la mezcla de Ac monoclonales, agregándose a un juego el Tipo 1 y al otro el Tipo 2 (Diluciones: 1:1000 en PBST + 20 % de Suero Fetal Bovino (para bloquear las uniones inespecificas).

Se incubaron por 1 hora a 37°C fueron lavadas con BST (Buffer-Suero Fetal Bovino- Tween) y se agregó a cada celda HRPO diluida 1:1000 en PBS /SFB, a razón de 100 microlitros /celda.

Luego de una incubación de 45 minutos a 37°C., se realizó otro ciclo de lavado y se agregaron 100 microlitros de sustrato cromógeno consistente en 280 microgramos de 3 AEC por mililitro de Buffer acetato con 0,01% de peróxido de hidrógeno.

Incubadas primeramente por 25 minutos a temperatura ambiente, se escurrieron las cubetas en toallas de papel y se dejaron orear. Observadas con microscopio invertido y a ojo desnudo, la coloración roja indicó la positividad de las reacciones.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se resumen en los siguientes cuadros:

Cuadro 1: Aislamiento e IFD para detección de antígeno viral del VDVB.

Total Muestras estudiadas	AISLAMIENTO POSITIVO // IF POSITIVA			AISLAMIENTO NEGATIVO // IF NEGATIVA
	TOTAL	CP	NCP	
54 (100%)	47 (87,03%)	39 (82,97%)	8 (17,02%)	7 (12,97%)

Cuadro 2: Sensibilidad y especificidad de las técnicas inmunoquímicas respecto del aislamiento viral.

AISLAMIENTO VIRAL				
I N M U N O Q U I M I C A		POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
	POSITIVOS	41 (a)	6 (b)	47
	NEGATIVOS	6 (c)	1 (d)	7
	TOTAL	47	7	54

Siendo:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a+c}$$

$$\frac{41}{41+6} \times 100 = 87,2\%$$

a+c

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{a}{a+b}$$

$$\frac{41}{41+6} \times 100 = 87,2\%$$

a+b

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{d}{c+d}$$

$$\frac{1}{1+6} \times 100 = 14,2\%$$

c+d

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{c+d}$$

$$\frac{1}{1+6} \times 100 = 14,2\%$$

b+d

* Todas las muestras estudiadas con anticuerpos monoclonales para diferenciar tipos 1 y 2 fueron positivas al tipo 1.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las técnicas inmunoquímicas para ser utilizadas como screening de células infectadas por el VDVB constituyen un método rápido, reproducible, confiable y de realización fácil en cortos tiempos y costos accesibles para poder ser incluidas en programas de control, dada la alta reproducibilidad y confiabilidad (por el alto valor predictivo positivo) sabiendo que un resultado negativo en IQ no excluye la presencia de la enfermedad y por lo tanto en estos casos deberán realizarse intentos de aislamiento o Reacción en cadena de la Polimerasa. Sumado a esto, la mayoría de las cepas con IF positivas y también IQ son pertenecientes al biotipo CP.

En razón de su sensibilidad, el método ha incrementado la posibilidad de testear e

identificar tempranamente la infección por el VDVB en células.

El mismo ofrece la ventaja de que las placas teñidas puedan evaluarse rápidamente por microscopia de inversión, no haciéndose necesarios equipos más costosos.

Además, la fijación de las células preserva su morfología, la cual puede ser objeto de otras evaluaciones citológicas retrospectivas (Fray *et al.*, 1998).

Su simplicidad y sensibilidad permiten a través de esta técnica detectar la presencia de infección con el VDVB, en plazos menores a los que demanda el aislamiento.

En nuestros ensayos la utilización del Suero Equino deslinda esta posibilidad de contaminación "espontánea" con el virus.

La técnica de IQ pone además al alcance de todos los Laboratorios que trabajan con

células y suero fetal bovino, un método accesible de control periódico. La preparación simultánea de gran número de inoculaciones de materiales problema en microsistemas y la posibilidad de fijación en determinado momento de la técnica, permite trabajos seriados, tinturas de gran cantidad de muestras originales y sucesivos sub-pasajes de cepas y/o materiales sospechosos, a la vez, con el consiguiente ahorro de tiempo y da la posibilidad de una pronta emisión de resultados.

Se estima que los resultados negativos en IQ podrían obedecer al aparentemente bajo título del virus en tales muestras, lo que podría deberse a escasos focos de replicación en las células estudiadas que no alcanzaron a exhibir coloración. En este sentido otro factor lo puede constituir el background de coloración, el cual puede hacer dificultosa o imposible la lectura si hubiera coloreadas sólo unas pocas células.

No obstante el nivel de background en la coloración podría variar de prueba a prueba, pero los ensayos hechos con Ac monoclonales no han mostrado en general apreciable ese efecto habiendo podido ser fácilmente distinguibles algunas pocas células infectadas (Castro *et al.*, 1997). El uso de Ac mono-clonales tiene la ventaja de la alta especificidad en la coloración, lo que elimina virtuales reacciones de background (Deregt *et al.*, 1998(a)).

A pesar de esto, una potencial desventaja de los Ac monoclonales en diagnóstico es su inherente no especificidad a determinados epitopes individuales. También lo es el caso de aquellas cepas virales que faltándole un epitope particular, podrían escapar a su detección (Deregt *et al.*, 1998; Ridpath, 1996). Es por esto que las pruebas de tipificación en T 1 y T 2 fueron desarrolladas con Ac monoclonales seleccionados como hábiles para reconocer varios epitopes conservados y lo que asegura la confiabilidad del ensayo

es que cada aislamiento pudo ser reconocido o no por más de un Ac monoclonal (Corapi *et al.*, 1990). Los resultados de este estudio muestran a la técnica IPMA con Ac monoclonales, como una buena alternativa para detección de los tipos 1 y 2.

AGRADECIMIENTO

Professor Dr. Ruben O. Donis. Department of Veterinary and Biomedical Science. University of Nebraska, East Campus Loop and Fair St. LINCOLN, NE, 68583 - 0905 U.S.A.

BIBLIOGRAFÍA

- BRODERSEN, B.W.; A. K WHITE; & D. R. SMITH.** 1998. Immunohistochemical test on skin biopsies as a method for detection of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. Proc Am. Assoc. Bov. Prac. 31: 246.
- CORAPI, W; R.O. DONIS & E. DUBOV.I** 1990. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus" -Am. J. Vet. Res- 51:1388-1394.
- CASTRO, M.; W. STOFFREGEN; G. BRIGMAN & K. HILLARD.** 1997. A method to detect bovine viral diarrhoea virus contamination in cell cultures using immunoperoxidase staining. J.Vet.Diagn. Invest. 9: 427-431.
- DEREGT, D.** 1998 (a). Mapping of a Type 1 specific and Type common epitope on the E 2 (gp 53) proteins of bovine viral diarrhoea virus with neutralization scape mutants. Virus Research. 53: 81-90.
- DEREGT, D.** 1998 (b). Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (Type 2) of bovine viral diarrhoea virus define three

- antigenic domains involved in neutralization. *Virus Research*. 57: 171-181.
- DEREGT, D. & K.G. LOWEN.** 1995. Bovine viral diarrhea virus, biotypes and disease. *Can Vet J*. 36: 371-377.
- DEREGT, D. & S. PRINS.** 1998. A monoclonal antibody –based immunoperoxidase monolayer (microisolation) assay for detection of Type 1 and Type 2-bovine viral diarrhea virus. *Can. J. Vet. Res.* 62: 152-155.
- DONIS, R.O.** 1995. Molecular biology of Bovine Viral Diarrhea Virus and its interactions with the host. *Food Anim. Pract.* 11:393-423.
- DUBOVI, E. J.** 1996. Laboratory diagnosis of Bovine Diarrhea Virus infections. *Vet. Med.* 91: 867-872.
- DUBOVI, E. J.** 1998. Bovine Viral diarrhea virus. Libro de Resúmenes y Conferencias: Encuentro Internacional sobre Herpesvirus Bovino tipo 1 y 5 e Virus da Diarreia viral Bovina (BVDV) Santa María. Brasil 22-24 Abril.
- FAO** (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) Red de cooperación Técnica ONU. 1998. Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico.
- FRAY, M.D.; H. PRENTICE; M. C. CLARKE & B. CHARLESTON.** 1998. Immunohistochemical evidence for the localization of bovine viral diarrhea virus, a single stranded RNA virus in ovarian oocytes in the cow. *Vet. Pathol.* 35: 253-259.
- GOLLAN, A. E.; R. RODRIGUEZ; M. E. NOGUÉS & H. OCCHI.** 2003. Diarreia Viral Bovina: estudios virológicos de un ternero con malformaciones. *Revista FAVE- Sección Ciencias Veterinarias*. Vol. 2 (1) 65-71.
- GOLLAN, A.E.; S.A. CHIMENO ZOTH; M.E. PICCONE; B. MARIÑO; C. PERALTA; R. RODRIGUEZ ARMESTO & H. OCCHI.** 2006. Aislamiento y caracterización del virus de la diarrea viral bovina en un ternero con síndrome purpúrico. *Arch. Med. Vet.* 38. Nº 2. 167-172-
- HAINES, D. M. et al.** 1992. Monoclonal antibody based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus formalin –fixed, paraffin embedded tissues. *Vet. Pathol.* 29:27-32.
- LEE, K.M. & J.H.GILLESPIE.** 1957. Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture –*Am. J.Vet.Res.* - 18: 952-953.
- LÉRTORA, W. J.** 2003. Diarreia Viral Bovina: Actualización. *Rev. Vet.* 14:1- 42-51.
- MANUAL OF STANDARDS FOR DIAGNOSTIC TEST AND VACCINES- 3RD EDITION.** 1996. Office International des Epizooties, Chpt. X 5- Bovine Viral Diarrhea. Paris- Francia.
- MEYLING, A.** 1984. Detection of BVD virus in viraemic cattle by an indirect peroxidase technique. *Recent Advances in Virus Diagnosis*-ed. MS. Mc Nulty & J.B. Ferranpp. 37-46-Boston-The Hague: Martinshoff Publishers.
- ODEÓN, A.; C. KELLING; E. MARSHALL; S. ESTELA; E. DUBOVI & DONIS, R.** 1999. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhea virus genotype II (NY –93). *J. Vet. Diagn. Invest.* – 11:221-228.
- REED, L. J. & H. MUENCH.** 1937. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- RIDPATH, J. F.** 1996. Sequence diversity and genotyping –International Symposium Bovine Viral Diarrhea virus –a 50 year Review- Cornell University –USA- pp- 39-42.
- SALIKI, J; R. FULTON; S. HULL & DUBOVI, E.** 1997. Microtiter virus isolation and Enzyme Immunoassays for detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in cattle serum . *Journal of Clinical Microbiology*- Vol. 35- Nº 4- p. 803-807.
- VILCECK, S.; A. J. HERRING; P. F. NETTLETON; J. P. LOWINGS ; D. J. PATON.** 1994. Pestiviruses isolated from pig, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch.*

Viol. 136:309-323, 1994.

ZABAL, O; A. KOBRAK; I. LAGER; A.A. SCHUDEL & E. WEBER. 2000. Contaminación del suero fetal bovino con virus de la Diarrea Viral Bovina. Rev. Arg. de Microbiología-32:32-37.