

CARACTERIZACION PROTEICA DE CEPAS COLOMBIANAS CITOPATICAS Y NO CITOPATICAS DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA*

Claudia T. Mendigaña**

Víctor J. Vera**

Luis Carlos Villamil**

Jairo Jaime**

RESUMEN

Se analizaron aislamientos de campo y de laboratorio de las cepas citopáticas (CP) y no citopáticas (NCP) nacionales y de referencia, del virus de la diarrea viral bovina (VDVB), mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida-dodecil sulfato de sodio) (SDS-PAGE) a partir de sobrenadantes clarificados parcialmente purificados de células de testículo bovino infectadas.

Los polipéptidos predominantes fueron los de 136, 116-118, 102-104, 95, 80, 69 y 20 kDa en cepas CP y proteínas de 116-124, 87, 75, 66-69 y 50 kDa en cepas NCP. La diferencia notable entre cepas, fue la no presencia de la proteína de 80 kDa en las cepas NCP.

En las cepas nacionales, la ausencia de proteínas de elevado peso molecular (120) (cepa CP-ICA) y presencia de una proteína de 31 kDa (cepa NCP-ICA), sugiere características diferenciales de nuestras cepas con relación a las de referencia. La evidencia de heterogeneidad entre los biotipos analizados del VDVB son de valor potencial en los estudios epidemiológicos moleculares.

INTRODUCCION

El virus de la Diarrea Viral Bovina, reconocido en muchas partes del mundo con un marcado impacto económico sobre la industria ganadera (Brownlie, 1985), es un virus RNA envuelto de cadena sencilla, que junto con el virus de la Enfermedad de las Fronteras (BD) de las ovejas y virus del Cólera Porcino

(HC), son prototipos del género Pestivirus, actualmente clasificados dentro de la Familia Flaviviridae (Horsineck et al., 1991; Greisser & Wilke, 1992; Kwang, 1992).

En la naturaleza existen dos biotipos del VDVB: el que induce citopatología en células bovinas infectadas y el que infecta sin conllevar citopatogenicidad (Lee & Guillespie, 1960). Ambos biotipos están involucrados en la patogénesis de la Enfermedad de las Mucosas (EM), manifestación clínica más severa de la infección por el VDVB.

El lento progreso en el entendimiento de la biología molecular del virus obedece a que los pestivirus no dan buena concentración de productos virales en células infectadas (Wilhelmsen et al., 1991), no permiten purificaciones completas por su estrecha relación con las células huésped (Dubovi, 1990); la necesidad de manipulaciones genéticas del virus e implicaciones a nivel de campo dada su patogénesis, limita los modelos animales (Brownlie, 1990; Tarry et al., 1991) y finalmente por fallas en el reconocimiento rápido de contaminación con VDVB en líneas, cultivos celulares y suplementos (Bolin et al., 1991; Dubovi et al., 1988; Vera y col., 1992).

El propósito del presente trabajo fue el de diseñar y evaluar metodologías que aseguraran la producción adecuada y estable del virus de DVB *In vitro*, a partir de multiplicación de las cepas en cultivo de células de testículo bovino y adelantar estudios en caracterización viral mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), de cepas

citopáticas y no citopáticas nacionales y de referencia; de ésta forma, establecer perfiles electroforéticos propios de cepa.

MATERIALES Y METODOS

1. Cultivos Celulares y Virus:

Se cultivaron células de testículo bovino (TB) en Medio Escencial Mínimo (MEM) (LAB.SIGMA) conteniendo 0.85 mg/ml de NaHCO₃, 100 U/ml Penicilina, 100 ug/ml de Estreptomicina (LAB.SIGMA), 5 mg/ml de Hidrolizado de Lactoalbúmina (LAB. SIGMA), 2.5 mg/ml de Anfotericina-B, 4mM de L-Glutamina (LAB.SIGMA) y 10% de Suero Fetal Bovino, libre de anticuerpos anti-VDVB y libre de presencia de virus adventicio de DVB (cepa NCP); siguiendo la metodología descrita por Donis & Dubovi (1988).

Los cultivos celulares y sueros fetales utilizados fueron confirmados como libres de virus y anticuerpos anti-DVB, mediante las pruebas de Inmunofluorescencia Directa (Fernelius, 1964) e Indirecta (Donis & Dubovi, 1987c), Inmunoperoxidasa (Bolin et al., 1991) e Interferencia viral (Sugiyama et al., 1984; Shirai et al., 1984).

Las cepas virales citopáticas fueron: cepa Singer, obtenida del National Animal Disease Laboratory (NADL, Ames, Iowa; USA) y cepa de campo aislada por el ICA (CP-ICA) de un brote natural de Enfermedad de las Mucosas presentado en la Sabana de Bogotá, reportada por González y col., en 1984 y suministrada por el Instituto Colombiano Agropecuario ICA.

Las cepas virales no citopáticas fueron: Cepa New York (NY) obtenida del NADL (Ames, Iowa; USA) y cepa de campo NCP-ICA aislada del mismo brote natural (González y col., 1984), suministrada por el ICA.

2. Multiplicación Viral:

Una vez obtenidas las monocapas celulares libres de virus adventicio de DVB y en pase adecuado (4° a 7° pase) (Renard et al., 1985; Pocock et al., 1987), se procedió a infectar obtener cosechas virales de adecuado título mediante pases sucesivos en cultivo de células de testículo, siguiendo el esquema de trabajo propuesto por Bolin et al. (1985).

Las cosechas virales se clarificaron por centrifugación a 6000 rpm por 30 minutos (Peters et al., 1986) a 4°C en centrífuga refrigerada (J2-21 Beckman, rotor JS7.5); se dializaron contra PBS pH 7.2 mediante membrana de diálisis por 48 horas a 4°C (Rossenbuch, comunicación personal, U. Iowa).

Las cosechas citopáticas fueron tituladas a las 48 horas postcosecha (Donis & Dubovi, 1987a) mediante la determinación de la Dosis Infectiva Tejido Celular 50 (DITC₅₀) (Mohanty et al., 1988). Las no citopáticas se titularon con base a los resultados de Inmunofluorescencia Indirecta en laminilla (Fernelius, 1964), Interferencia viral (Sugiyama et al., 1984; Shirai et al., 1984) e Inmunoperoxidasa en microplaca (Bolin et al., 1991).

3. Caracterización Viral:

Se seleccionaron las cosechas con mayor infectividad y contenido

* El presente trabajo se realizó en el Postgrado en Salud y Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, con el apoyo de la Corporación Andina de Fomento (CAF) mediante el proyecto titulado "Desarrollo, normalización y aplicación de kits diagnósticos para el virus de la Diarrea Viral Bovina".

** Respectivamente: DMV MSc.; DMV MSc.; DMV PhD; DMV MSc (candidato). Universidad Nacional de Colombia.

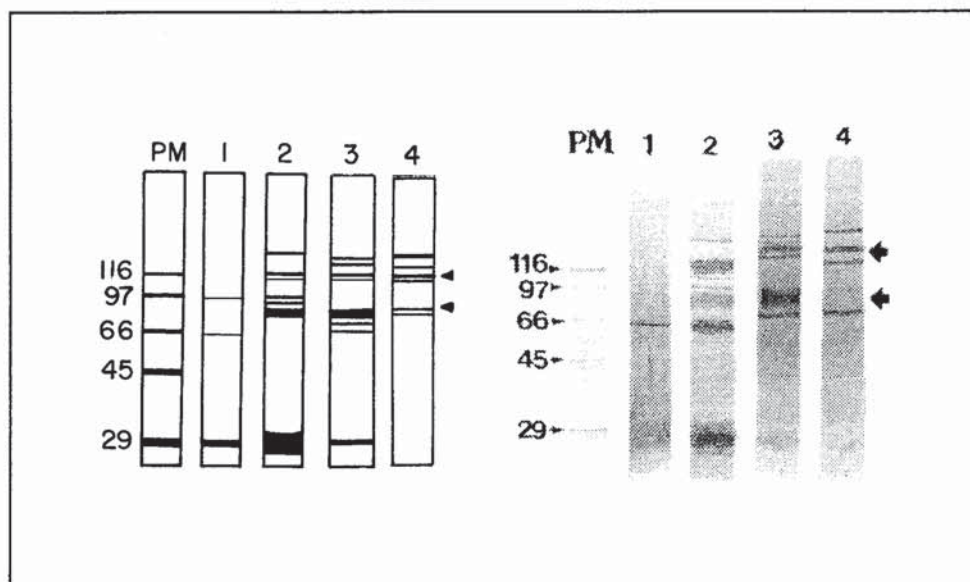


FIGURA 1. SDS-PAGE de cepas CP. Tinción de coomasie. 1. control TB; 2. CP-Singer; 3. CP-ICA 24 H; 4. CP-ICA 48H.

protéico para la caracterización de las proteínas virales por medio de electroforesis en geles de poli-acrilamida-SDS utilizando el método discontinuo descrito por Laemmli (1970).

De acuerdo al peso molecular del virus y a lo reportado en la literatura (Collet et. al., 1988; Donis & Dubovi, 1987a; Pocock et. al., 1987) se trabajó con geles al 10% de acrilamida, en un equipo de minielectroforesis (SE 250-Migthy Small II Slab Gel Electro-phoresis Unit. HOEFER). Se evaluaron dos técnicas de coloración: azul de coomasie (Laemmli, 1970) y tinción de plata (Merril et. al., 1981) a fin de encontrar mayor resolución.

El cálculo de los pesos moleculares de las proteínas virales se realizó siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970) con relación a un patrón de pesos conocido (MW SDS 200. SIGMA) (SIGMA, 1988).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Cultivos Celulares

Sólo los cultivos que resultaron negativos a dos de las pruebas (Inmunofluorescencia, Interferencia Viral o Inmunoperoxidasa) se consideraron libres de virus adventicio (Cepa NCP) y se utilizaron en el desarrollo del presente estudio.

2. Multiplicación Viral

Las cosechas virales se obtuvieron a las 24 horas (Corapi et. al.,

1990) y máximo a las 48 horas post-infección (P.I) (Lewis et. al., 1991).

2.1. Cepas Citopáticas

Los títulos virales de la Cepa CP Singer en cosechas 24 horas post-infección oscilaron entre 1×10^6 DITC₅₀/ml a $1 \times 10^{8.3}$ DITC₅₀/ml, títulos similares a los reportados por Donis & Dubovi (1987c) en cultivo de células de testículo bovino. La cepa CP ICA presentó títulos de $1 \times 10^{4.5}$ DITC₅₀/ml a las 24 horas y $1 \times 10^{6.3}$ DITC₅₀/ml a las 48 horas post-infección.

2.2. Cepas No Citopáticas

Las cepas NCP se cosecharon a las 48 horas de acuerdo a lo reportado por Lewis et al (1991). La mejor determinación del título se logró mediante la prueba de Inmunoperoxidasa en microplaca (Bolin et. al., 1991), con títulos de $1 \times 10^{7.3}$

DITC₅₀/ml (cepa NCP-ICA) y $1 \times 10^{6.8}$ DITC₅₀/ml (cepa NCP-NY).

3. Caracterización Viral

Las cosechas virales fueron suspendidas en buffer muestra de electroforesis (2% SDS, 5% 2-Mercaptoetanol; 62.5 mM TRIS-HCL pH 6.8) y calentadas a 100°C por 5 minutos (Bolin, 1988), antes de hacer la corrida electroforética.

3.1. Cepas Citopáticas

Tinción Coomasie

Se caracterizaron las proteínas virales de las cepas Singer (24 hrs P.I) e ICA (24 y 48 hrs P.I) (Donis & Dubovi, 1987d) (Tabla 1).

Los sobrenadantes de células sin infectar como controles, presentaron polipéptidos con pesos

moleculares (PM) aproximados de 87-95K, 65-70K y 21K. La presencia de proteínas de origen aparentemente celular en las cosechas virales ocurrió por que la infección por el virus no induce un impedimento suficiente de la síntesis proteica celular sino hasta que los cambios citolíticos son evidentes (Donis y Dubovi, 1987b).

Se confirmó la naturaleza citopática de las cepas por la presencia de los polipéptidos virales de PM de 116 y 80 kDa (Figura 1). Esto estuvo de acuerdo a lo reportado por Bolin et. al. (1988) y Corapi et. al. (1990) quienes encontraron estas proteínas inmunodominantes en las células infectadas.

Se identificaron polipéptidos con PM entre 144 y 21 kDa.

Los de alto peso molecular (144 kDa) se atribuyeron no solo a precursores virales no degradados sino también a proteínas posiblemente, de origen celular o bien, residuos de inmunoglobulinas provenientes del suero utilizado en el medio de cultivo para su multiplicación (Kwang, 1992).

Se encontraron diferencias entre la cepa nacional (CP-ICA) y la de referencia (CP-Singer), en cuanto a número y peso molecular de los polipéptidos, probablemente por grados variables de glicosilación de una misma proteína (Corapi et. al., 1990) o migraciones aberrantes de una misma proteína sobre el gel (Collett et. al., 1988b).

La cepa Singer presentó proteínas mayores (133-138 y 144kDa) que no las reveló la cepa ICA. De otra parte, la cepa ICA no permitió caracterizar proteínas por encima de los 128 kDa, pero sí proteínas de 75 y 69 kDa. Esto podría servir como un patrón diferencial entre

TABLA 1 CARACTERIZACION VIRAL POR SDS-PAGE DE CEPAS CP SINGER E ICA OBTENIDAS COMO SOBRENADANTES CLARIFICADOS Y TINCION CON AZUL DE COOMASIE											
CEPA	ORIGEN	TITULO*	POLIPEPTIDOS (Peso Molecular [PM] en kDa)								
SINGER	Test. 24H	$10^{8.3}$	144	133-138	123	116-118	102	95	82		21
ICA	Test. 24H	$10^{4.5}$			124	120	116	103	80	75	69
	Test. 48H	$10^{6.3}$			128		118		90-93	70	

* Título: DITC₅₀/ml.

TABLA 2
CARACTERIZACION VIRAL POR SDS-PAGE DE CEPAS CP SINGER E ICA OBTENIDAS COMO SOBRENADANTES CLARIFICADOS A PARTIR DE CULTIVO DE CELULAS DE TESTICULO Y TINCION DE PLATA

CEPA	TITULO*	POLIPEPTIDOS (Peso Molecular [PM] en kDa)											
		120	102	96	89	83	76	70-73	67	60	48	38	25
SINGER	10 ^{8.3}												
ICA	10 ^{6.3}		102	96	89	83		73	67	60	48	38	

* Título: DITC₅₀/ml.

cepas de referencia y las aisladas en el país (Figura 1).

La cosecha a las 48 horas P.I de la cepa ICA, perdió proteínas de grupos importantes antigénicos del virus como fueron las de 80, 52-55, 47-65 kDa. Esto se explicó como lo reporta Akkina (1991) a un procesamiento co-traduccion de las poliproteínas virales o degradación de las mismas por parte de las proteasas celulares (Deregt et. al., 1991).

La proteína de 80 kDa presentó PM entre 80-82 kDa, a diferencia de la proteína de 125 kDa, la cual presentó una considerable heterogeneidad con PM entre 116-124 kDa. Estos resultados son similares a los reportados por Collett (1988b) quien no encontró migraciones heterogéneas para la p80 y Greisser/Wilke et al (1992) quienes reportan migraciones desde 114 a

128 para la p125. Se encontró un alto grado de conservación de los polipéptidos virales de 120, 80 y 48 kDa entre las dos cepas CP.

Tinción de Plata

Se hizo corrida electroforética de los sobrenadantes clarificados de las cosechas virales Singer e ICA 24 hrs P.I (Tabla 2).

La sensibilidad de ésta tinción se evidenció por un mayor número de bandas detectadas; así, en la cepa Singer, proteínas entre 120 y 25 kDa y en la cepa ICA proteínas entre 102 y 38 kDa. (Figura 2).

Proteínas mayores (120 kDa) no aparecieron en ninguna de las dos cepas; esto se explicó, porque aunque la cepa original fue la misma que se utilizó en la tinción de

coomasie, la cosecha de estas cepas se obtuvo en un pase mayor del cultivo lo cual como lo sugiere Deregt et. al., (1991), lo hace más susceptible a la infección viral, ocasionando que el procesamiento proteolítico de los péptidos mayores, característico del VDVB ocurra más tempranamente. Esto también explicó la mejor resolución en las bandas de menor peso molecular.

3.2. Cepas No Citopáticas

Tinción Coomasie:

Se evaluó la cepa NCP nacional (ICA) y la NCP de referencia (NY), cosechadas a las 48 horas P.I (Tabla 3), (Figura 3).

El control de células mostró polipéptidos de 72, 79 y 21 kDa. Las cepas presentaron uniformidad

electroforética. La cepa ICA presentó mayor cantidad de proteínas (5) con PM entre 120-66 kDa (Figura 3). Las dos cepas NCP presentaron la proteína de 116 kDa (Corapi et. al., 1990; Donis & Dubovi, 1987a) y no presentaron la de 80 kDa propia de las cepas CP (Collett et. al., 1988a; 1988b).

Tinción de Plata:

Utilizando la técnica de tinción de plata (Merril et. al., 1981), se caracterizaron las proteínas de las mismas cepas NCP NY e ICA. (Tabla 4), (Figura 4).

Los sobrenadantes de células sin infectar (control) sometidos a igual procedimiento, presentaron bandas de 124, 86, 78 y 73 kDa.

La tinción de plata permitió detectar 4 bandas por encima de la tinción de coomasie, diferenciando hasta 12 péptidos. Comparando el perfil electroforético de las cepas NCP con el control, se dedujo que proteínas con PM de 86 y 73 kDa eran de origen celular.

Las dos cepas NCP compartieron la presencia de polipéptidos de origen viral con PM entre 115-118, 60-64 y 22-25 kDa (Figura 4) similar a las descritas por otros autores (Donis & Dubovi, 1987b; Bolín et. al., 1989). A diferencia de lo reportado por Donis & Dubovi (1987b), no fue posible detectar proteínas de 165 y 55kDa en nuestro estudio, a pesar de la sensibilidad de la técnica. Esto se explicó por una rápida degradación de la proteína de 165 kDa como lo sugiere Akkina (1991) y a la heterogeneidad en las propiedades oligosacáridas de la proteína de 55 kDa que le hubieran permitido migraciones anómalas (a 60 kDa) como lo describen Pocock et al (1987).

La cepa NCP-ICA mantuvo proteínas de mayor peso (118, 121 kDa) y manifestó una nueva proteína de 31 kDa (Figura 4) no reportada por otros autores (Bolí et. al., 1989; Donis & Dubovi, 1987b), la cual podría constituirse en una proteína característica de nuestra cepa.

La cepa NCP-NY a diferencia de la cepa NCP-ICA, no presentó bandas por encima de los 115 kDa, pero manifestó proteínas de bajo peso molecular (15 kDa) no reportada por otros autores (Donis & Dubovi, 1987; Bolín et. al., 1989).

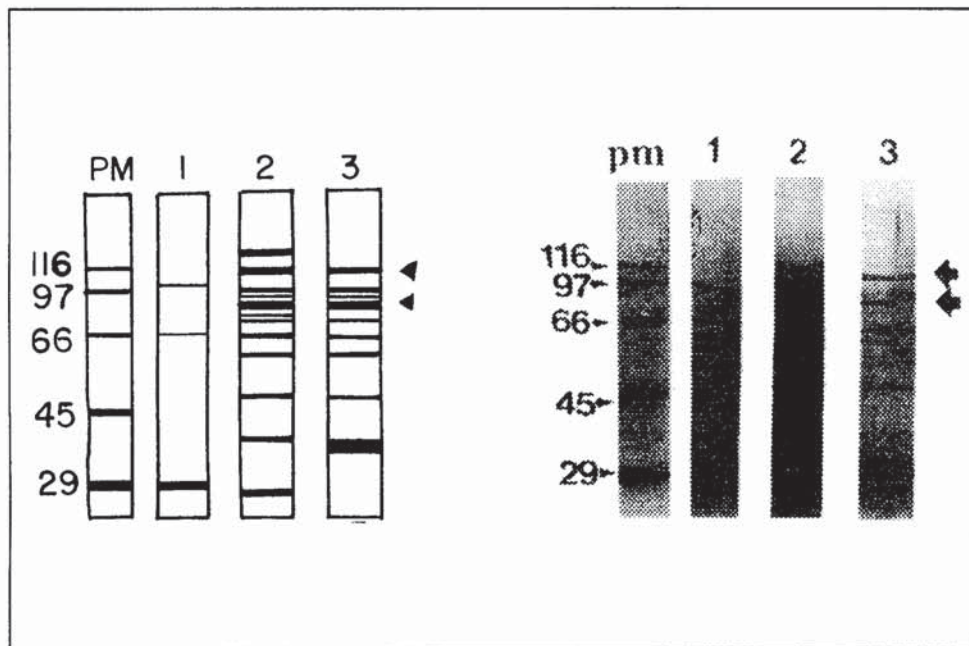


FIGURA 2. SDS-PAGE de cepas CP. Tinción de plata.
1. Control TB; 2. CP-Singer; 3. CP-ICA.

3.3. Cepas Citopáticas vs Cepas No Citopáticas

Tinción de Coomassie

Todas las cepas CP mostraron proteínas de 116-123 kDa y 80-82 kDa, a diferencia de las cepas NCP las cuales no marcaron en ningún caso las proteína de 80-82 kDa pero sí, la de 116-122 kDa específico de la cepa viral (Corapi et. al., 1990; Deregt et. al., 1991; Meyers et. al., 1991) (Figuras 1 y 3).

Las cepas CP presentaron tres bandas más que las NCP (Tablas 1 y 3) correspondientes a proteínas de alto PM : 133-138 y 144 kDa fuera de la de 80-82 kDa. La proteína de 133-138 kDa parece ser relativamente estable en cepas CP, así como lo reporta Akkina (1991). La de 144 kDa se detectó sólo en la cepa CP Singer (Figura 1).

Las cepas NCP a diferencia de las cepas CP no demostraron proteínas por debajo de los 52 kDa (Figura 3) posiblemente debido, a la baja sensibilidad de ésta tinción (Nalty & Yemoan, 1988).

La cepa ICA CP y NCP (Figuras 1 y 3) aisladas de un mismo brote presentaron un perfil electroforético muy similar, compartiendo el 61% (8/13) de las proteínas.

Tinción de Plata

Al igual que con la tinción de coomassie, se observaron las pro-

teínas específicas para cada tipo de cepa CP y NCP (Tablas 2 y 4).

La bondad de ésta tinción permitió diferenciar bandas de interés en el estudio actual del VDVb, como fueron proteínas de 115-120, 80-83, 67, 51-60, 41-48, 38 y 22-25 kDa para las cepas CP (Figura 2) y un perfil similar para las cepas NCP, a excepción de la proteína de 80-83 kDa (Figura 4). Estos resultados estuvieron de acuerdo a los reportados por otros autores (Bolin et. al., 1989; Akkina, 1991).

La presencia de una banda de 44 kDa predominante en la cepa NY y ausente en la cepa NCP nacional (ICA) (Figura 4), está de acuerdo a lo reportado por Donis & Dubovi (1987b) quienes trabajando con diferentes cepas NCP, detectaron dominio del polipéptido de 44-48 kDa en la cepa NY.

TABLA 3
CARACTERIZACION VIRAL POR SDS-PAGE DE CEPAS NCP ICA Y NY OBTENIDAS COMO SOBRENADANTES CLARIFICADOS EN CULTIVO DE TB Y TINCION DE COOMASIE

CEPA	TITULO*	POLIPEPTIDOS (Peso Molecular [PM] en kDa)					
NCP-ICA	10 ^{7.3}	120	116		87	75	66
NCP-NY	10 ^{7.5}	120	116	113		78	

*Título: DITC₅₀/ml.

La presencia de la proteína de 31 kDa característica de nuestra cepa (NCP-ICA) (Figura 4), sugiere un patrón diferencial con relación a la cepa de referencia.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se desarrolló un estudio comparativo entre cepas nacionales y cepas de referencia del virus de la DVB. los análisis de caracterización de proteínas, permitieron establecer perfiles electroforéticos propios de cada cepa viral:

- Se encontró un alto grado de conservación de las proteínas de 116-118 y 80-82 kDa en cepas citopáticas (CP) y proteína de 116-125 kDa en cepas no citopáticas (NCP) del VDVb.
- Los polipéptidos inducidos en células infectadas por cepas

CP del VDVb encontrados con mayor frecuencia, fueron los de peso molecular de 136, 116-118, 102-104, 95, 80, 69 y 20 kDa y proteínas de 116-125, 87, 75, 66-69 y 50 kDa en cepas NCP.

- Este trabajo sugiere características diferenciales entre las cepas aisladas en Colombia y las de referencia. Al comparar las cepas citopáticas ICA y Singer se encontró un 75% de similitud en sus perfiles electroforéticos. La mayor diferencia obedeció a la no presencia de proteínas por encima de los 120 kDa en la cepa nacional (ICA). La ausencia de proteínas mayores en ésta cepa, en geles a una concentración de acrilamida del 10%, sugieren la proyección de futuras investigaciones que utilicen diferentes concentraciones de acrilamida (7.5 - 8%) para poder corroborar su presencia.
- Entre las cepas no citopática nacional (ICA) y la de referencia (NY), el grado de similitud fue menor que en el caso de las cepas citopáticas; siendo del 54%. La presencia de una proteína de 31 kDa en la cepa nacional, no ha sido reportada por la literatura ni en cepas de campo ni en las de referencia, por lo tanto, se constituye como una proteína característica de nuestra cepa.
- A partir del hallazgo de ésta proteína (31 kDa en cepa NCP-ICA), se recomienda adelantar investigaciones que permitan utilizarla en la evaluación de una posible respuesta inmune de ganado infectado persistentemente, así como también, en lo referente a sus implicaciones desde el punto de vista molecular.
- Como paso siguiente en el estudio comparativo entre cepas

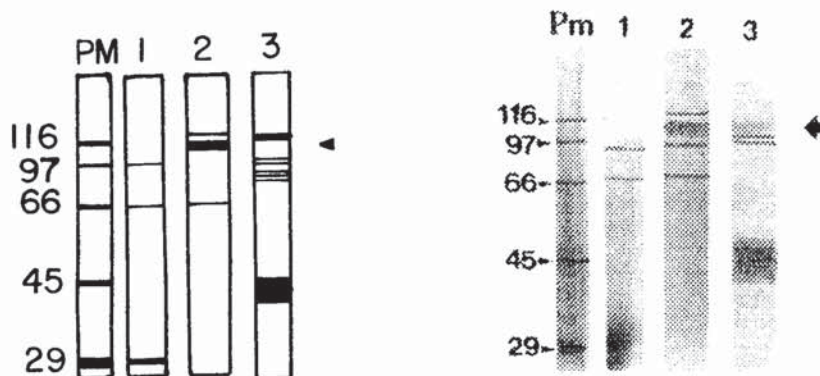


FIGURA 3. SDS-PAGE cepas NCP. Tinción de coomassie. 1. Control TB; 2. NCP-ICA; 3. NCP-NY.

TABLA 4
CARACTERIZACION VIRAL POR SDS-PAGE DE CEPAS NCP ICA Y NY OBTENIDOS COMO SOBRENADANTES
CLARIFICADOS A PARTIR DE CULTIVO DE CELULAS DE TB Y TINCION DE PLATA

CEPA	TITULO*	POLIPEPTIDOS (Peso Molecular [PM] en Kilodaltons [kDa])															
		121	118		99	92	86		76	73			64			31	25
NCP-ICA	10 ^{7.3}																
NCP-NY	10 ^{7.5}			115	99		86	78	76	73	70	67	60	44	41		22 15

* Título: DITC₅₀/ml.

CP y NCP de referencia y las nacionales, se recomienda la realización de un "finger printer", para diferenciar efectivamente estas cepas y evaluar su pureza.

- Las Cepas CP (ICA) y NCP (ICA) aisladas en Colombia de un brote de enfermedad de las mucosas, presentaron un perfil electroforético relativamente similar, manifestando como diferencia, la ausencia de la proteína de 80 kDa en la cepa NCP.
- La presencia de proteínas de origen aparentemente celular podría deberse a que la infección por el virus de DVB, induce un impedimento suficiente para

la síntesis protéica celular, únicamente hasta estados tardíos, cuando los cambios citolíticos son evidentes. Por lo tanto, se recomienda para futuras investigaciones, radiomarcas las proteínas virales y detectarlas mediante la técnica de radioinmunoprecipitación (RIP). La RIP permitirá detección más amplia de los polipéptidos virales así como también de sus precursores protéicos.

- Las diferencias en los perfiles electroforéticos de las cosechas obtenidas a las 48 horas, en relación con las de 24 horas postinfección, sugieren una pérdida de proteínas virales por

efecto de las proteasas celulares o por clivajes proteolíticos propios del virus de DVB. Sería recomendable el empleo de inhibidores de proteasas para evitar la degradación de dichas proteínas.

- Para el estudio de las proteínas del virus de la DVB obtenidas a partir de cosechas virales de baja calidad (baja concentración de proteína), se sugiere la utilización de la tinción de plata para los geles de poliacrilamida, dada su mayor sensibilidad si se compara, con la de azul de coomasie.
- La caracterización de la respuesta antigénica de los bovi-

nos anti-VDVB mediante la técnica de Inmunoblotting constituiría un apoyo para el diagnóstico del virus a nivel de campo, al identificar los polipéptidos virales que inducen mayor respuesta inmune en el animal.

Las cosechas obtenidas a partir de cultivo de células de testículo bovino, permitieron realizar la caracterización de las proteínas del VDVB. Por lo tanto, se recomienda éste, como un tejido apropiado y de primera elección para los estudios con el VDVB en nuestro medio.

A partir de los resultados de esta investigación se determinó como tiempo óptimo para cosechar las cepas citopáticas, entre 24 y 48 horas postinfección. Si el objetivo es realizar caracterización viral a partir de estas cosechas, se recomienda la obtención de las mismas a las 24 horas. Para las cepas no citopáticas resulta adecuado un lapso de 48 horas postinfección del cultivo celular.

La técnica de Inmunoperoxidasa en placa resultó ser la más adecuada para la evaluación de cepas NCP del VDVB.

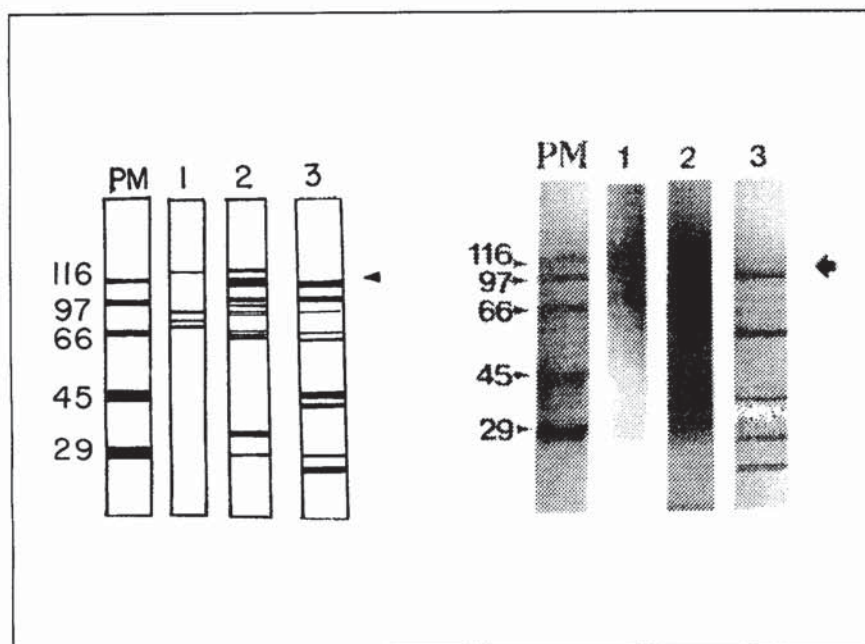


FIGURA 4. SDS-PAGE cepas NCP. Tinción de plata.
 1. Control TB; 2. NCP-ICA; 3. NCP-NY.

BIBLIOGRAFIA

- AKKINA, R. K. 1991. Pestivirus bovine viral diarrhea virus polypeptides: identification of new precursor proteins and alternative cleavage pathways. *Virus Research*. 19: 67-82.
- BOLIN, S. R. 1988. Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res*. 49(7): 1040-1044.
- BOLIN, S. R.; LITTLEDIKE, E. T.; RIDPATH, J. F. 1991. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea viruses in a vaccinated herd. *Am J Vet Res*. 52 (7): 1033-1037.
- BOLIN, S. R.; MATTHEWS, P. J. & RIDPATH, J. F. 1990. Methods for detection and frequency of contamination of calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest*. 3: 199-203.
- BROWNLIE, J. 1985. Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. *Farm Practice*. 7(6): 197-202.
- COLLETT, M.S.; LARSON, R.; BELZER, S.K. & RETZEL, E. 1988a. Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology*. 165: 200-208.
- COLLETT, M.S.; LARSON, R.; GOLD, C.; STRICK, D.; ANDERSON, D.K. & PURCHIO, A.F. 1988b. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*. 165:191-199.
- COLLETT, M.S.; MOENING, V. & HORSINEK, M.C. 1989. Recent advances in pestivirus research. *J Gen Virol*. 70: 253-266.
- CORAPI, W.V.; DONIS, R.O. & DUBOVI, E.J. 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(9): 1388-1394.
- DEREGT, D.; MASRI, S. A. & CHO, H. J. 1991. Bovine viral diarrhoea virus proteins: relatedness of p125 with p80 and p125 and evidence of glycoprotein processing. *Can J Micro*. 37: 815-822.
- DONIS, R. O. & DUBOVI, E. J. 1987a. Characterization of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *J Gen Virology*. 68: 1597-1605.
- _____ 1987b. Glycoproteins of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in infected bovine cells. *Journal of General Virology*. 68: 1607-1616.
- _____ 1987c. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. *Virology*. 158: 168-173.
- DUBOVI, E.J. 1990. Molecular biology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*. 9(1): 105-114.
- DUBOVI, E.J.; CORAPI, W. & DONIS, R.J. 1988. Probing the antigenic diversity of cytopathic and noncytopathic BVD virus with monoclonal antibodies. *Amer-Ann-Veterinary Lab Diagn 29th Annual Proceedings*. 258-270.
- FERNELIUS, A.L. 1964. Noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus detected and titrated by immunofluorescence. *Can J Com Med Vet Sci*. 28: 121-126.
- GREISER-WILKE, I.; DITTMAR, K.E.; LIESS, B. & MOENING, V. 1992. Heterogeneous expression of the non-structural protein p80/p125 in cells infected with different pestiviruses. *J Gen Virol*. 73: 47-52.
- HORSINEK, M.C. 1991. Pestivirus: taxonomic perspectives. *Arch Virol Suppl*. 3: 1-5.
- KWANG, L.; LITTLEDIKE, E. T.; DONIS, R. O. & DUBOVI, E. J. 1992. Recombinant polypeptide from the gp 48 region of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detects serum antibodies in vaccinated and infected cattle. *Vet Microb*. 32: 281-292.
- LAEMMLI, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- LEE, K.M. & GILLESPIE, J.H. 1960. Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. *Am J Vet Res*. 18: 952-953.
- LEWIS, T.L.; RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. & BERRY, E.S. 1991. Detection of BVD viruses using synthetic oligonucleotides. *Arch Virol*. 117: 269-278.
- MERRILL, C.R. GOLDMAN, D.; SEDMAN, S.A. & EBERT, M.H. 1981. Silver Staining: Method more sensitive than dye staining with coomassie brilliant blue. *Science*. 211: 1437.
- MEYERS, G.; TAUTZ, N.; DUBOVI, E.J. & THIEL, H.J. 1991. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin coding sequences. *Virology*. 180: 602-616.
- MOHANTY, S.B.; DUTTA, B. & SUNKANTA, K. 1988. *Virologia Veterinaria*. Ed. Interamericana. 18-38.
- PARK, B. 1991. Studies on viral polypeptide processing by bovine viral diarrhoea virus. Thesis of Master of Science. Iowa State University. 1-12.
- PETERS, W.; GREISSER-WILKIE, I.; MOENING, V. & LIESS, B. 1986. Preliminary serological characterization of bovine viral diarrhoea virus strains using monoclonal antibodies. *Vet Microb*. 12: 195-200.
- POCOCK, D.H.; HOWARD, C.J.; CLARKE, M.C. & BROWNLIE, J. 1987. Molecular variation between BVD virus isolates. *Pestivirus infections of ruminants/*
- edited by J.W. Harkness. Luxembourg: Commission of the European Communities. 43-51.
- RENARD, A.; BROWN-SHIMMER, S.; SCHMETZ, D.; GUIOT, C.; DAGENAIS, L.; PASTORET, P.P.; DINA, D. & MARTIAL, J. 1987. Molecular cloning sequencing and expression of BVDV RNA. *Pestivirus Infections of Ruminants/Edited by J.W. Harkness*. Luxembourg: Commission of the European Communities. 53-63.
- ROSSENBUCH, R.F. 1993. *Comunicación Personal*. Iowa University. U.S.A.
- SHIRAI, J.; TANAKA, Y. & HORIUCHI, T. 1984. Interference patterns between strains of bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD) virus. *Jpn. J. Vet. Sci*. 46 (6): 901-904.
- SIGMA CHEMICAL COMPANY. 1988. SDS molecular weight markers in a discontinuous buffer. S.C.C. St Louis. USA. 1-8.
- SUGIYAMA, M.; ITOH, O. & SASAKI, H. 1984. Difference in ability to cause interference of homologous strains of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Ann. Rep. Natl. Vet. Assay. Lab*. (21): 11-17.
- VERA, V.J.; PARRA, J.L.; RAMIREZ, G.C. & VILLAMIL, L.C. 1992. El virus de la DVB como agente contaminante en cultivo de tejidos animales. *Biomedica. Revista del Instituto Nacional de Salud*. Santafé de Bogotá. Volumen 12 (1): 10-14.
- WILHELMSEN, C.L.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. & KLUGE, L.P. 1991. Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired MD or with naturally acquired chronic BVD. *Am J Vet Res*. 52(2): 269-275.
- WISKERCHEN, M. & COLLETT, M.S. 1991. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polypeptide processing. *Virology*. 184:341-350.