

PCR Y SECUENCIAMIENTO DE LA GLICOPROTEINA gp53 DEL VIRUS DE DVB A PARTIR DE SUERO DE UN BOVINO PERSISTENTEMENTE INFECTADO

Gloria Consuelo Ramírez Nieto*
David Paton**

RESUMEN

El virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB) fue extraído de suero de un animal persistentemente infectado, directamente y después de un pase en células de turbina bovina. Se hizo transcripción reversa del RNA viral y se amplificó usando una técnica optimizada de PCR. En el caso de RNA viral extraído directamente de suero fue necesaria una doble amplificación usando primers internos. Se purificó un pool de productos de PCR y se clonó en *E. coli* para producir bandas de DNA sencillas específicas del virus y que representarían el gen de la glicoproteína gp53.

Se hizo secuenciamiento de al menos tres clones diferentes conteniendo inserciones derivadas de suero y de lisado celular respectivamente.

Se secuenció el gen completo de gp53 (1100 pb) tanto para suero como lisado celular, usando para ello siete primers de iniciación y siete reversos. Las dos secuencias se compararon entre sí y con una derivada del virus obtenido del mismo animal persistentemente infectado dos años antes.

Se investigó igualmente la estabilidad antigénica de la gp53 durante el tiempo, usando para ello un panel de 23 anticuerpos monoclonales específicos.

No se detectaron diferencias en la secuencia de nucleótidos de la gp53 cuando se obtuvo bien sea directamente de suero o después de pasaje en cultivo de células. Además, no se observaron diferencias cuando estas dos secuencias se compararon con aquella obtenida dos años antes. De manera si-

milar los dos virus evaluados mostraron un patrón de reactividad idéntico frente al panel de anticuerpos monoclonales usados en este estudio.

INTRODUCCION

El virus de DVB es un patógeno importante del ganado a nivel mundial. Está estrechamente relacionado con los virus de Enfermedad de las Fronteras y Cólera Porcino, junto con los cuales forma el género pestivirus (Paton, et al., 1992). Este es un grupo de virus RNA de polaridad positiva, pequeños (12-13 Kb), con envoltura (Moening y Phagemann, 1992; Diderholm y Dinter, 1966).

Dentro de las proteínas estructurales del virus la primera es p20, seguida por p14, la cual representa la proteína de nucleocápside (Thiel, et al., 1991), a continuación se encuentran las tres glicoproteínas de pestivirus maduro gp48, gp25 y gp53 (Collett, 1992). Las siguientes proteínas representan la región que codifica para las proteínas no estructurales p125 en células infectadas con VDVB NCP y en el caso de VDVB CP dos productos adicionales p54 y p80. Actualmente se considera que la proteína p80 representa el único polipéptido marcador de VDVB CP (Meyers, et al., 1991; Donis y Dubovi, 1987; Pocock, et al., 1987). Siguiendo p125 se encuentra una región que codifica para un polipéptido de 42 KDa y la región que codifica para la proteína no estructural final de los pestivirus p133 (Collett, et al., 1991).

Las tres glicoproteínas maduras gp48, gp25 y gp53 probablemente representan glicoproteínas de envoltura viral y como tal posiblemente

están involucradas en la adsorción del virus a las células, en tropismo celular y en importantes reacciones inmunológicas del huésped al virus (Collett, et al., 1988; Boulanger, et al., 1991; Weiland, et al., 1990).

Desde el punto de vista patogenicidad, el VDVB es considerado como un patógeno importante de ganado bovino con un impacto económico a nivel mundial. En condiciones naturales infecta bovinos (Roeder y Drew, 1984; Brownlie, et al., 1984; Pocock, et al., 1987; Bolin, 1991), porcinos (Terpstra y Wensvoort, 1988), ovinos (Barlow, 1990), caprinos (Baker, 1987) y muchos rumiantes salvajes (Nettleton, et al., 1980). Los síndromes clínicos producidos cubren un amplio rango, desde infecciones inaparentes o síntomas medios hasta Enfermedad de las Mucosas, con desenlace fatal (Moening y Plagemann, 1992).

En suero de terneros virémicos persistentemente infectados el virus es fácilmente detectable, con títulos promedio de 10^3 a 10^4 TCDI50%/ml (Bielefeldt Ohmann, 1988).

En cuanto al diagnóstico de laboratorio de la infección por pestivirus, éste se basa en la detección del virus o componentes virales y/o la demostración de una respuesta serológica al virus, para lo cual es necesario contar con células susceptibles, actividades en medio sin ninguna actividad anti-pestivirus.

Existe una gran necesidad por métodos sensibles y rápidos para detectar VDVB en diferentes muestras. Las técnicas usadas corrientemente para detectar y/o aislar VDVB, tanto en cultivo celular contaminado así como en muestras clí-

nicas obtenidas de animales persistentemente infectados con infección aguda (aislamiento de virus, inmunohistoquímica) son poco sensibles o requieren largo tiempo por lo cual no proveen resultados diagnósticos rápidos o son inapropiadas para evaluación a gran escala (Fernelius, 1964; Rossi y Kiessel, 1971).

El PCR es un método *in vitro* para la amplificación enzimática de una secuencia específica de DNA dirigida por primers (Saiki, et al., 1985). Se usan ciclos repetitivos de desnaturalización, acople y extensión, para generar copias múltiples del DNA específico. La técnica es capaz de sintetizar más de un millón de copias de una secuencia blanco de DNA en unas pocas horas y ha sido usada para detección tanto de DNA como RNA viral (Byrne, et al., 1988; Gama, et al., 1988; Kwok, et al., 1987). Cuando se parte de RNA viral se requiere un paso previo de transcripción reversa para generar DNA (DNA complementario) antes de la amplificación por PCR.

La aplicación de PCR (Reacción de Polimerasa en Cadena) es útil en el diagnóstico de pestivirus (Belák y Ballagi-Pordány, 1991; Brock, 1991), permitiendo la detección y amplificación de ácido nucleico viral a partir de muestras tales como suero y semen, con la gran ventaja de obviar el uso de cultivos celulares.

Otro uso promisorio del PCR sería en el análisis de muestras de leche para la detección del VDVB. Esto brindaría un método rápido y muy efectivo para evaluar infección por VDVB a nivel de hato (Brock y Radwan, 1992).

* M.V., MSc., Profesora del Postgrado de Salud y Producción Animal. Línea de Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia.

** M.A., Vet. M.B., PhD., M.R.C.V.S. Central Veterinary Laboratory, Weybridge, U.K.

MATERIALES Y METODOS

El virus de DVB utilizado en este estudio fue aislado originalmente de un ternero persistentemente infectado en una finca en Inglaterra, donde tanto los cerdos como los bovinos estaban infectados.

El virus aislado del ternero fue pasado seis veces en cultivo de células de testículo. Una gran parte del gen de la glicoproteína gp53 de dicho virus fue secuenciado (Paton, 1992). Esta secuencia (FCI) fue usada como base para comparar los resultados de éste experimento, en el cual el virus aislado a partir del mismo animal fue secuenciado nuevamente después de transcurridos dos años.

El RNA viral fue extraído a partir de muestras de suero y lisado celular de virus cultivado en células de cometa bovino libres del VDVB. Se hizo transcripción reversa para obtener el cDNA y se amplificó usando la técnica de PCR. Después de un PCR sencillo o doble con primers internos, el DNA amplificado se usó para el clonaje y secuenciamiento de DNA específico.

El RNA viral fue extraído de tres muestras de suero del animal persistentemente infectado, usando una mezcla de isotiocianato de guanidinium y fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitando el RNA extraído con volúmenes iguales de isopropanol. Se emplearon dos métodos, uno el recomendado por Brock (1991), con dos modificaciones y otro el recomendado por Alansari (1993), el cual implica un paso previo de concentración viral por ultracentrifugación a 150.000 g por dos horas a 4°C.

Como control negativo se usó un suero de cabra, el cual se sometió simultáneamente al mismo procedimiento que las muestras problema, esto con el fin de verificar la ausencia de contaminación cruzada entre muestras.

En el caso del lisado celular, el RNA fue preparado a partir de células de cometa bovino usando extracción con fenol, siguiendo el método desarrollado por Stallup y Washington en 1983 y descrito por Sambrook, et al., 1989.

Partiendo de un frasco de cultivo celular las células fueron abiertas 1:2, uno de los cultivos resultantes fue infectado con 1 ml de suero proveniente del animal persistentemente infectado y el

TABLA 1 PRIMERS Y CONDICIONES OPTIMAS PARA EL PCR		
PAR DE PRIMERS	SECUENCIA	CONDICIONES DE AMPLIFICACION
PEST 1	CCT GAT AGG GTG CTG CAG AG	Denat. 95°C (1 m) Ext. 60°C (1 m)
PEST 2*	TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC	30 ciclos
QF	TTT GTC GAC AGA GAT TTA ACA CGC ATT TGG	Denat. 95°C (45 s) Acople 50°C (1 m) Ext. 72°C (2 m)
Z511*	TTT GAA TTC GAA ATA TGT CAC CAC TTC A	25 Ciclos Ext. adicional 72°C (5 m)
C912	TTT GTC GAC TGA TAA CAG GGG TAC AAG G	Denat. 95°C (45 s) Acople 60°C (1 m) Ext. 72°C (2 m)
E701*	TTT GCA TCC TGT CGT GTG TTA GCAAGT TG	25 Ciclos Ext. adional. 72°C (5 m)

* Primers reversos.

otro sirvió como control negativo. De la misma forma fueron preparados los controles positivo y negativo usados en la estandarización del PCR.

Transcripción reversa (RT): La primera banda de cDNA fue sintetizada con la enzima transcriptasa reversa. La mezcla de reacción en un volumen de 20 ul, (conteniendo 2.5 ul del RNA extraído, 2 ul de buffer PCR 10X, 2 ul dNTPs, 2 ul MgCl₂, 10 ul dH₂O, 0.5 ul RNAsin, 0.5 ul transcriptasa reversa y 0.5 ul del primer reverso) se puso a reaccionar en un termobloque (Biometra TRIO-Thermoblock), bajo las siguientes condiciones: 37°C (30 min.), seguido por 95°C (5 min.) y finalmente 4°C (infinito).

Reacción de polimerasa en cadena (PCR): La segunda banda de cDNA se preparó en un volumen de reacción de 100 ul usando todo el producto de la síntesis de la primera banda, 8 ul de buffer PCR 10X, 1 ul de Triton X-100, 70 ul de agua destilada y 0.5 ul de primer de iniciación. Las mezclas fueron cubiertas con 2 gotas de aceite mineral para prevenir evaporación y se precalentaron a 70°C antes de adicionar 0.5 ul de la enzima Taq polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en un termobloque siguiendo un patrón de ciclos de acuerdo con el par de primers y las condiciones óptimas previamente establecidas (Tabla 1).

Se usaron como controles negativos RNA extraído de suero de cabra y uno adicional de agua destilada.

En el caso de RNA viral extraído a partir de muestras de suero se empleó doble amplificación usando un par de primers internos. El producto amplificado producido con el par de primers externos (QF-Z511) se usó como blanco para un segundo PCR con el par de primers internos (C912-E701).

La presencia de productos de PCR se detectó mediante electroforesis en gel. Se adicionó bromuro de etidio con el fin de visualizar las bandas al observarlas bajo luz ultravioleta.

La presencia de RNA de VDVB se confirmó inicialmente por amplificación de un fragmento de 72-74 bp, usando los primers Pest1-Pest2. Este es un fragmento pestivirus específico (Wirz, et al., 1993) (Figura 1).

TABLA 2 TITULOS DE VIRUS EN MUESTRAS DE SUERO DEL ANIMAL PI		
I.D.	FECHA RECOLECCION	TITULO
116962	10/ 1/91	ND
6246	16/ 4/91	10 ^{3.9} /50ul
6266	15/ 5/91	10 ^{4.25} /50ul
6428	4/12/92	10 ^{2.75} /50ul
6432	2/ 2/93	10 ^{2.75} /50ul
6438	16/ 4/93	10 ^{2.6} /50ul
6461	22/ 6/93	10 ^{2.6} /50ul

I.D.: Número de identificación.
ND: No determinado.

TABLA 3
COMPARACION DE REACTIVIDAD ANTIGENICA A UN PANEL DE 23 ANTICUERPOS MONOCLONALES

DIL. VIRUS	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	No.
Dil-mAb.	I-F	I-F	I-F	I-F	
115-1/160	+ +	+ +	+ +	+/- +/-	1
162-1/160	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	2
163-1/640	++ ++	++ ++	++ ++	+ -	3
165-1/320	- -	- -	- -	- -	4
215-1/320	++ ++	++ ++	++ +	+ -	5
158-1/80	- -	- -	- -	- -	6
170-1/80	- -	- -	- -	- -	7
214-1/80	++ ++	++ ++	++ ++	+ -	8
438-1/160	- -	- -	- -	- -	9
460-1/160	- -	- -	- -	- -	10
546-1/160	- -	- -	- -	- -	11
381-1/160	- -	- -	- -	- -	12
384-1/160	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	13
CA1-1/16	+ +	+ +	+ +	+/- +/-	14
CA34-1/16	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	15
CA36-1/16	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	16
CA39-1/16	+ +	+ +	+ +	+ -	18
CA78-1/16	- -	- -	- -	- -	19
CA80-1/8	- -	- -	- -	- -	20
CA82-1/32	+ +	+ +	+ (+)	+ -	21
C12-1/8	- -	- -	- -	- -	22
C42-1/20	- -	- -	- -	- -	23
CT6-1/40	+ +	+ +	+ +	(+) (+)	24

I: Aislamiento inicial del virus (116962)
 F: Aislamiento final del virus (2 años después) (6438)
 ++: Fuertemente positivo +: Positivo -: Negativo
 (+): Menos del 50% de las células infectadas en el pozo

El PCR simple fue optimizado modificando condiciones con base en un programa de ciclos preestablecido. Se usaron diferentes condiciones de temperatura de acople, tiempo de extensión y número de ciclos.

Para la optimización de las condiciones buffer de el PCR doble se usó un kit comercial (PCR Optimizer™).

Clonaje: Partiendo del producto de diez réplicas de PCR (a partir de suero y lisado celular respectivamente) se corrió electroforesis del "pool" de reacción en gel de bajo punto de licuefacción y se extrajo el cDNA con una matriz de sílica (Prepagent™), se cortó usando enzimas de restricción apropiadas

(BamHI, Sall) y se ligó en vector digerido de manera similar y tratado con fosfatasa alcalina de ternero (pBluescript™ II KS+/-, Stratagene™) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La cepa de *E. coli* XL1-Blue (Stratagene™) se transformó con este vector usando el método de CaCl₂ (Sambrook y Col., 1989) y las bacterias transformadas fueron seleccionadas por crecimiento en medio sólido LB suplementado con 50 ug/ml de ampicilina, 12.5 ug/ml de tetraciclina, 80 ug/ml X-Gal y 20 mM IPTG.

Las colonias conteniendo insertos se seleccionaron por color, la estrategia de clonaje se representa esquemáticamente en la Figura 2. Las colonias de *E. coli* XL-Blue ampicilina resistentes

con gen Lac-Z alterado (color blanco), indicando transformación probable con plasmidos recombinantes fueron clonadas.

Brevemente, el procedimiento fue el siguiente, las colonias blancas individuales se tomaron y se inocularon en medio 2XYT el cual contenía 0.5 ul de ampicilina (100 mg/ml) y 1 ul de fago VCSM13, posteriormente se adicionó Kanamicina. Después de un período de incubación apropiado las bacterias fueron removidas por centrifugación y el fago-ssDNA se extrajo del sobrenadante clarificado. La presencia de inserto se verificó por electroforesis en gel, comparando la migración con aquella del fago sin inserto (Paton, 1992).

Secuenciamiento: La banda simple de DNA fue secuenciada usando ³⁵S ATP (Amersham, UK), la enzima Sequenasa y primers oligonucleótidos derivados de datos de secuencia de Bluescript o del VDVB. El método empleado fue el de terminación dideoxi: de acuerdo al protocolo Sequenase™ (Paton, 1992).

Las mezclas de acoplamiento incluyeron 3-5 ul de ssDNA, 2 ul buffer de reacción y 1 ul del primer, se llevaron a 10 ul de volumen final con agua destilada.

A los 10 ul de mezcla de acoplamiento se adicionaron 1 ul DTT 0.1M, 2 ul de mezcla de marcación diluida apropiadamente, 0.5 ul ³⁵S y 2 ul de Polimerasa Sequenase diluida.

Para preparar las reacciones de terminación se precalentaron a 37°C cuatro tubos que contenían 2.5 ul de A, G, T y C respectivamente y a cada uno de estos se adicionaron 3.5 ul de la reacción de marcación; las reacciones fueron detenidas usando la solución correspondiente.

Las muestras se precalentaron a 75°C por dos minutos inmediatamente antes de sembrarlas en el gel de secuenciamiento.

Las reacciones de secuenciamiento se separaron en sus componentes oligonucleótidos usando el sistema de secuenciamiento Sequagel™. Después de corrida la electroforesis los geles fueron fijados, secados al vacío, se hizo autoradiografía de los mismos y se leyó usando el digitador DNA-Star seq-easy. Las secuencias fueron procesadas usando el programa DNASTAR (DNASTAR Ltd., London).

Además del secuenciamiento, cinco muestras diferentes de suero del animal persistentemente infectado se titularon en células de corne bovino.

Así mismo, se usó un panel de 23 anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glicoproteína gp53 del VDVB para comparar la reactividad antigénica de los dos virus aislados a partir del mismo animal persistentemente infectado con un intervalo de dos años. Estos anticuerpos muestran considerable discriminación en el reconocimiento de diferentes aislamientos de VDVB.

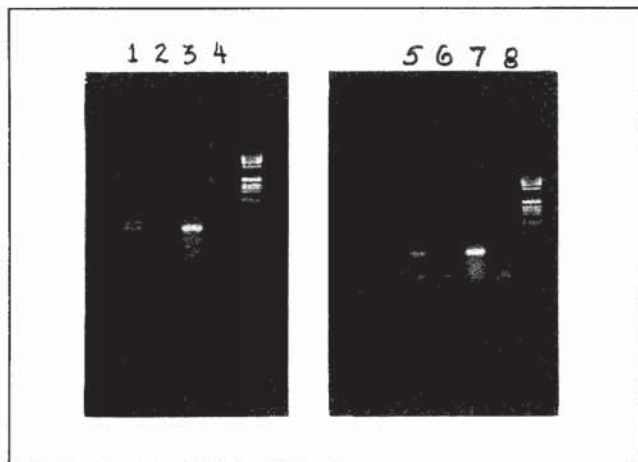


FIGURA 1. Fragmento producido por PCR usando el par de primers PEST1-PEST2 (ultracentrifugation)

1. A partir de suero 116962
2. Control negativo de RNA para 116962
3. RNA control positivo
4. Agua destilada
5. A partir de suero 6246
7. RNA Control positivo
8. Agua destilada

RESULTADOS Y DISCUSION

Se titularon seis muestras de suero del animal persistentemente infectado (Tabla 2).

Utilizando las condiciones óptimas de PCR se amplificó un fragmento de cDNA de 1100 bp tanto a partir de suero como de lisado celular infectados con virus de VVB. Este fragmento representa el gen completo de gp53 de VDVB (Figura 3).

Para amplificación a partir de suero fue necesario usar un par de primers internos (C912-E701), además del par Qf-Z511. En el caso de lisado celular solo se necesitó un ciclo de amplificación usando los primers C912-E701.

El cDNA amplificado fue extraído de un gel de bajo punto de licuefacción, ligado en plasmido Bluescript y usado para transformar *E. coli* de la cepa XL-Blue. Se seleccionaron colonias blancas conteniendo el plasmido recombinante y se cultivaron en presencia del fago ayudador VCSM13 para obtener ssDNA. La comparación electroforética de este DNA con el tipo silvestre VCSM13 reveló la presencia de una inserción gp-53 específica.

Al menos tres clones diferentes de ssDNA se obtuvieron y secuenciaron para suero y lisado celular.

El gen completo de gp53 de mas o menos 1100bp fue secuenciado usando siete primers de iniciación y siete reversos (Figura 4).

No se detectaron diferencias en la secuencia de nucleótidos de gp53 del VDVB al comparar los productos del PCR obtenidos directamente de una muestra de suero con aquellos producidos después de un pasaje del mismo virus en células de turbina bovina.

La secuencia de nucleotidos para gp53 obtenida en este experimento fue igualmente la misma que aquella producida por Paton en 1992 de una muestra pasada varias veces en cultivo celular, tomada dos años antes del mismo animal persistentemente infectado.

El patrón de reacción de anticuerpos monoclonales para los aislamientos temprano (11692) y final (6438) del virus del suero persistentemente infectado se encontró que era idéntico para el panel de 23 anticuerpos monoclonales gp53 específicos usados en este estudio (Tabla 3).

El PCR ha demostrado ser una valiosa técnica para la detección y estudio de un amplio rango de virus, incluyendo el VDVB. Sus ventajas incluyen extrema sensibilidad y un rango casi ilimitado de diferentes especificidad y velocidad de realización. Adicionalmente, el producto

del PCR se puede usar para análisis genético.

Dentro de las ventajas en el uso del PCR, además de la naturaleza de la técnica está el hecho de que se evita el uso de cultivo de tejidos en el diagnóstico de VVB, lo cual es de gran importancia debido a las dificultades involucradas en el mantenimiento de cultivos celulares libres de VDVB, sumado al tiempo y altos costos requeridos para detección del virus. Así mismo variantes NCP del VDVB pueden requerir dos o tres pasajes antes que se acumulen cantidades detectables del antígeno viral en el cultivo celular. Además brinda la posibilidad de detectar el virus en muestras que resultan tóxicas para los cultivos celulares como es el caso de muestras de semen (Belák y Ballagi-Pordany, 1993; Hertig, et al., 1991). Por otro lado, los métodos tradicionales de detección dependen de la presencia de partículas infectivas de VDVB, en contraste, el PCR detecta ácido nucleico viral aún cuando el virus haya sido inactivado (Belák y Ballagi-Pordany, 1993). Sumado a

esto está el hecho de que, como se produce una amplificación, se detectan números muy bajos de moléculas de ácido nucleico viral en las muestras analizadas (Belák y Ballagi-Pordany, 1993).

Desde el punto de vista investigativo, con el desarrollo de PCR para VDVB, es posible amplificar secuencias y comparar fragmentos de DNA provenientes de cepas de laboratorio y aislamientos de campo. Además, la comparación entre cepas CP y NCP podría brindar una base genética para detectar las diferencias entre los dos biotipos del VDVB aislados (Shroeder y Balasus-Chan, 1990).

El principal problema del PCR es su extrema sensibilidad, la cual algunas veces ofrece resultados positivos inespecíficos. Además, el riesgo de contaminación cruzada es muy alto cuando se emplea un PCR doble con primers internos, por lo cual se deben extremar las medidas de precaución durante su ejecución.

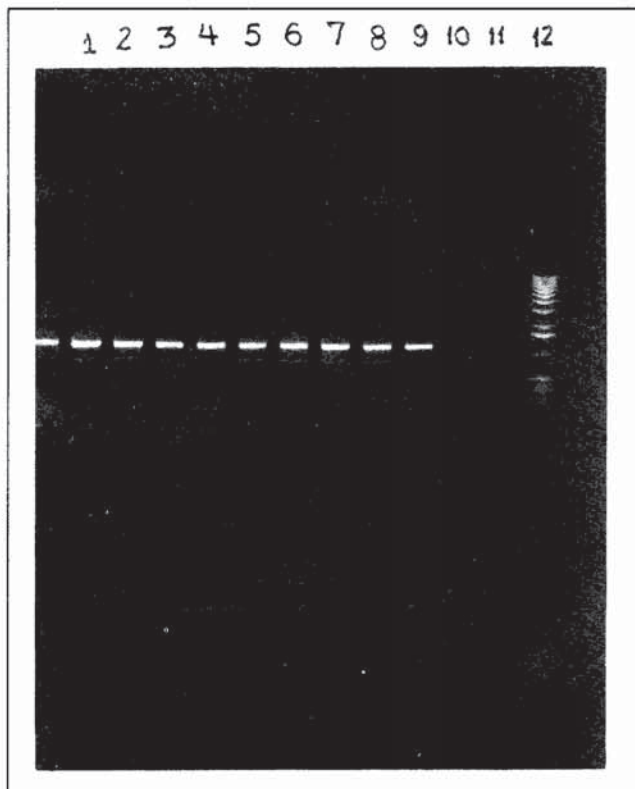


FIGURA 3. Diez repeticiones independientes de productos de PCR (Fragmento gp53) Primers: C912-E701.

- 1 a 10: Repeticiones de PCR. RNA 6438
- 11 : RNA Control negativo para RNA viral 6438
- 12 : Control negativo (dH₂O)

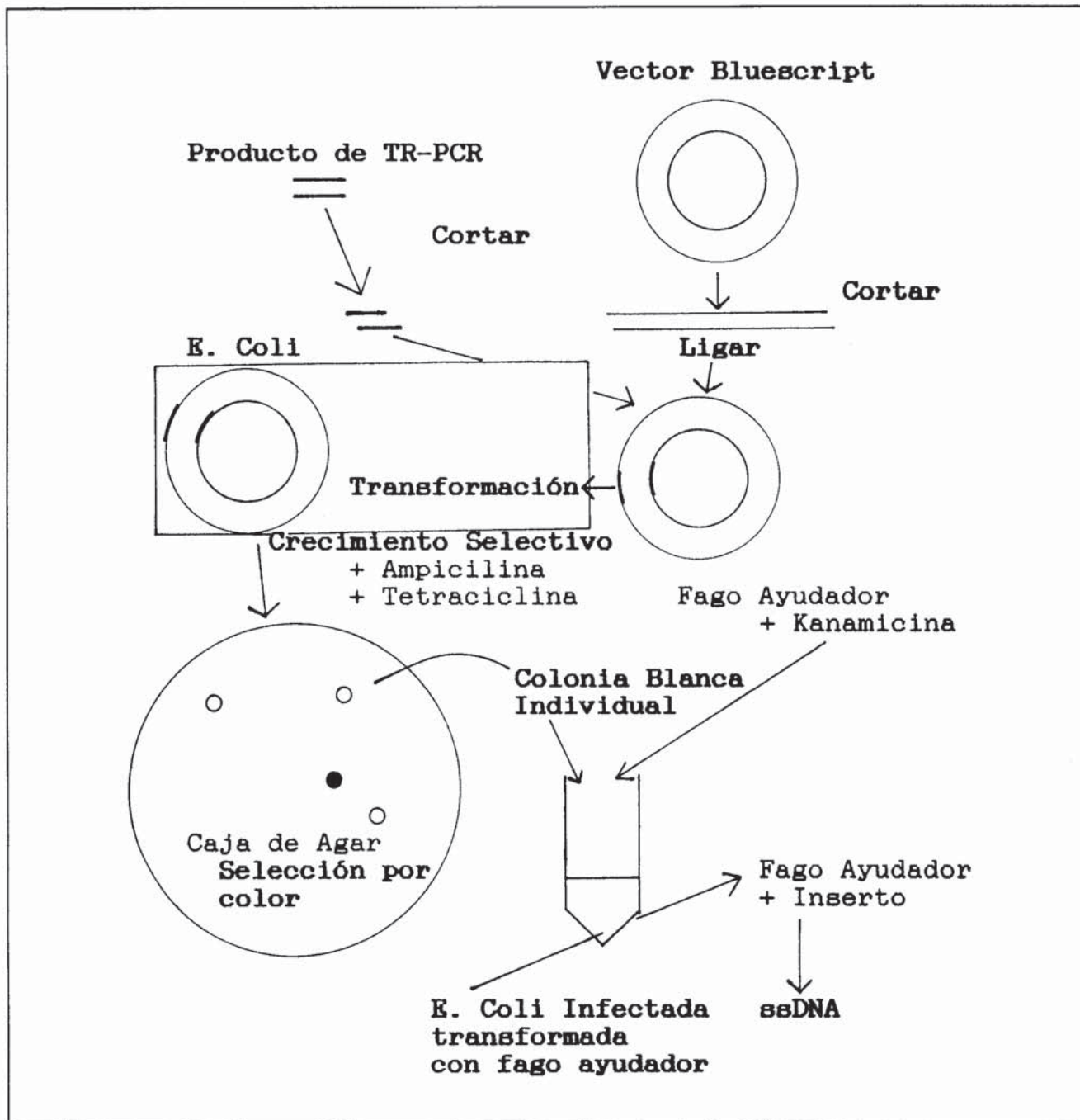


FIGURA 2. Estrategia para la producción de insertos de ssDNA específicos.
Adaptado de Paton, 1992

Debido a que éste es un virus RNA, uno de los problemas para su detección, es que el PCR solo amplifica DNA y de esta manera el RNA viral debe ser extraído primero de la muestra y después sometido a transcripción reversa. El mayor inconveniente radica en que el RNA es fácilmente destruido por RNAsas las cuales están presentes en muchas muestras biológicas

y el RNA viral es susceptible al ataque por tales enzimas una vez es removido de su cubierta protectora. De esta manera en el caso de VDVB, aunque pueden estar presentes grandes cantidades de virus en un animal persistentemente infectado, el procesamiento y extracción de RNA genómico de VDVB intacto continúa siendo difícil y este

puede ser un paso limitante en la prueba de PCR.

En este estudio la secuencia del gen de gp53, para RNA de DVB aislado a partir de suero, fue idéntica a aquella obtenida por RT-PCR después de un pasaje en cultivo celular, e idéntica a aquella obtenida por Paton (1992), esto sugiere que la gp53 no es afectada por gran nú-

mero de pases en un animal persistentemente infectado o por un número pequeño de pasajes en cultivo celular in vitro.

De acuerdo con lo anterior se podría sugerir, que si la gp53 es estable en animales persistentemente infectados, entonces debe existir otra fuente de diversidad, debido a que se sabe que el gen es altamente varia-


```

1  GGAATCACA TATGCCATAG CCAAAGATGA AAGAATTGGC CCACTAGGGG
51  CCGAAGGCCT CACCACCACA TGGAAAGATT ACTCGCATGA AATGATTCTG
101 GAAGACACAA TGGTTATAGC TTGGTGCAAA GATGGAAAGT TTACATACCT
151 CCAAGGTGC ACAAGAGAAA CCAGATATCT CGCAATCTTG CATTCAAGAG
201 CTTTACCAAC CAGTGTGGTG TTCAAAAAAC TTTTGTATGG GCGAAGGCAA
251 GAGGACGAAG TCGAAATGGA CGATAACTTT GAGTTTGGAC TTTGCCCATG
301 CGATGCCAGG CCCATAGTAA GGGGGAATT CAACACAACA CTGCTAAATG
351 GACCAGCCTT CCAGATGGTA TGCCCTATAG GGTGGACAGG GACTGTAAGC
401 TGTATGCTAG CTAATAGGGA TACCCTAAGC ACGGTAGTGG TACGGACGTA
451 CAGGAGGTCC GTTCCATTTC CTTACAGACA AGGCTGTATC ATCCAGAAAA
501 CCCTGGGGGA GGATCTCTAT AGCTGTGTCC TTGGAGGAAA TTGGACTTGT
551 GTGACTGGAG ACATGTACG GTACACAGGG GGCTCTATTG AATCCTGCAA
601 GTGGTGTGGT TTTAAATTTT AAAAAAGTGA GGGACTACCA CACTACCCCA
651 TTGGTAAGTG TAGATTGGAG AATGAGACTG GCTATAGATT AGTAGATGAC
701 ACCTCTTGCA ACAGGGAAGG TGTGGCCATA GTACCACATG GGACAGTAAA
751 GTGCAAGATA GGAGACACAA TTGTACAGGT TATAGCTATG GACTACTAAC
801 TTGGCCCTAT GCCTTGCAAA CCACACGAGA TCATATCAAG CGAGGGGCCT
851 GTGGAAAAGA CGGCATGCAC ATTCAATTAC ACGAAGACAC TAAAAAATAA
901 ATACTTTGAG CCCAGAGACA GTTACTTTCA GCAATACATG CTAAAAGGAG
951 AGTATCAATA CTGGTTTGAC CTGGAGGTAA CTGACCATCA TCGAGACTAC
1001 TTCGCCGAAT CCATATTGGT GGTGGTGGTA GCCCTCCTGG GTGGCAGATA
1051 CGTGCTCTGG TTA CTGGTTA CATACTGGT TTTATCAGAA CAAAAGGCCT
1101 TAGGAGCTCA GTACGGAGCA GGGGAAGTAG TGATGATGGG CAACTTGCTA
1151 ACACACGACA ACATT

```

FIGURA 4. Secuencia del GEN de gp53 del VDVB proveniente de suero 6438.

ble entre cepas. Probablemente el paso de un animal a otro, durante una infección aguda, sea la fuente de tal diversidad. Bajo estas circunstancias el sistema inmune tenderá a seleccionar mas que a retener variantes, mientras que la

expansión clonal del virus en el huésped recientemente infectado, probablemente permitirá el establecimiento de una población mayor nueva, especialmente si la dosis infectante fue pequeña. Esto tiene implicación significativa en la

epidemiología del VDVB, sugiriendo que aunque los animales persistentemente infectados pueden ser los mayores reservorios del VDVB, ellos no son el medio por el cual se generan las nuevas cepas citopatogénicas.

El hallazgo de que un bajo nivel de pasaje in vitro no influye en la secuencia obtenida para gp53 sugiere que se pueden hacer comparaciones entre virus cultivados, lo cual confirma la validez de dichos estudios.

REFERENCIAS

ALANSARI, H.; BROCK, K.V., and POTGIETER, L.N.D., (1993). Single and double polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhoea virus in tissue culture and sera. *Journal of*

Veterinary Diagnostic Investigation 5: 148-153.

BAKER, J.C., (1987). Bovine viral diarrhoea virus: a review. *Journal of the American Veterinary Me-*

dical Association 190: 1449-1458.

BARLOW, R.M., (1990). Border Disease virus. In: *Virus Infections or Ruminants*. Z. Dinter and

B. Morein (ed.). Elsevier, Amsterdam.

BELAK, S., AND BALLAGI-PORDANY, A., (1993). Application of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in veterinary diagnostic