

INFECCION PERSISTENTE CON EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) EN HATOS LECHEROS DE LA SABANA DE BOGOTA*

Jairo Jaime C.**
Luis C. Villamil**
Victor Vera**
Gloria Ramírez N.**

RESUMEN

Con el objeto de establecer si en nuestro país hay presencia de animales inmunotolerantes, persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) se planteó una investigación con base en un estudio previo serológico longitudinal de un año. A partir de los resultados obtenidos se determinaron los animales que permanecieron seronegativos o con títulos bajos y se tomaron como fuente para buscar PI.

Para la detección de este grupo de animales se planteó un estudio usando cultivos de células polimorfonucleares (PMN). Se emplearon tres variantes de la técnica buscando una mejor detección viral, para lo cual se produjeron anticuerpos específicos al virus y se estandarizó la prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IPI).

Los resultados mostraron por primera vez para nuestro país la presencia de animales inmunotolerantes persistentemente infectados con el VDVB. La importancia de este hallazgo radica en que estos animales diseminan la enfermedad de forma constante. Se sugiere a partir de este aporte la implantación de medidas tendientes a controlar la presencia de este tipo de animales en los hatos.

INTRODUCCION

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB), descubierto hace ya cerca de 50 años, se ha convertido en uno de los agentes más importantes para la producción pecuaria mundial; los reportes inter-

nacionales señalan que más del 50% de la población bovina es seroreactora al agente.

Dentro de la epidemiología de la enfermedad, uno de los eslabones más importantes y tal vez la llave para el control de la misma, lo constituyen los animales persistentemente infectados (PI).

La importancia de los animales PI dentro de la diseminación de la enfermedad radica en que al ser diagnosticados como seronegativos, se convierten en los mayores diseminadores y además constituyen un mecanismo por medio del cual el virus perdura en la naturaleza.

REVISIÓN DE LITERATURA

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) fue por primera vez reconocido en 1946 en Estados Unidos por Olafson et al. y en Canadá por Childs (Magar y Lecomte, 1987; Park, 1991); quienes reportaron una patología caracterizada por fiebre, diarrea y anorexia. Posteriormente su presencia fue reportada en Gran Bretaña en 1956 (Roeder et al. 1984). El virus se descubrió en asociación con otras epizootias caracterizadas por diarrea y lesiones erosivas del tracto digestivo (Baker, 1987; Ernst et al., 1983).

El espectro de enfermedades asociadas con VDVB incluyen piroxia en infecciones subclínicas, diarrea viral bovina, inmunosupresión, aborto y momificación (Park, 1991), defectos congénitos, inmunotolerancia e infección persistente (Bolin, 1985) y Enfer-

medad de las Mucosas (EM) aguda y crónica (Baker, 1987; Kelling et al., 1990).

El VDVB pertenece a la especie *pestivirus*, recientemente se ha clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* (Atluru et al. 1992; Corapi et al. 1989; Hooft et al. 1992), basado en la distribución de los ácidos nucleicos y en la distribución de las bases codificadoras de las diferentes regiones (Collet, 1992; Collet et al. 1988a).

Antigénicamente se encuentra relacionado con el virus de la peste porcina clásica (Fernelius et al. 1973) (el cual tiene una longitud menor que el VDVB) (Duboví, 1990) y el virus de la Enfermedad de las Fronteras de las ovejas (Baker, 1987; Bonniwell et al. 1987; Moening, 1990; Terpstra y Wensvoort, 1988).

Los virus aislados de casos clínicos de DVB se diferencian en dos biotipos según su habilidad de inducir efectos citopáticos en los cultivos celulares: una forma *Citopática (CP)* la cual destruye las células infectadas y una forma *NC Citopática (NCP)* la cual no las lisa (Baker, 1987; Bolin, 1985; Hooft van Iddelkinge et al. 1992; Pocock et al. 1987). Duboví (1986) estudiando el tropismo viral por los diferentes tipos celulares encontró que los virus NCP presentan afinidad especialmente por las células *linfocitarias* mientras que las CP infectan células epiteliales (Duboví, 1986).

La patogénesis de la enfermedad cuando esta ocurre en el período prenatal es de especial interés y constituye la mayor dificul-

tad en el estudio de la DVB. Cuando el feto aún no es inmunocompetente, el virus no es reconocido como un agente extraño y si la infección no ocasiona muerte fetal, se origina un animal persistentemente infectado (PI) siendo inmunotolerante a la cepa infectante cuando alcanza el desarrollo del sistema inmune (Moening, 1990). Estos animales se convierten en los principales diseminadores de la enfermedad, pues eliminan por el resto de su vida virus a través de la saliva y aerosoles; y tienen como característica la de carecer o poseer niveles muy bajos de anticuerpos circulantes para la cepa infectiva (Bolin, 1988; Corapi et al. 1988; Wilhelmssen et al. 1991). En DVB este cuadro aparece asociado casi exclusivamente a la infección con cepas NCP, estos animales por lo general son aparentemente sanos (Baker, 1987; Duboví, 1986).

Los animales inmunotolerantes son *inmunológicamente tolerantes a los virus homólogos* de DVB o producen pequeñas cantidades de anticuerpos neutralizantes, mientras que pueden ser inmunocompetentes a cepas heterólogas (Bielerfeldt y Bloch, 1982) y también frente a otros antígenos, ejemplo: IBR, PI-3 y *P. haemolítica* (Baker, 1987).

Los niveles séricos en este tipo de animales son significativamente menores para IgG2 (Roberts et al. 1988b), mientras las concentraciones séricas son aceptables para IgG1, IgM y IgA (Roth et al. 1986). En oportunidades se encuentra manifestación de respuesta a algunas cepas CP (Corapi

Proyecto "limitantes en salud y producción de bovinos", financiado Respectivamente: DMV, MSc.; DMV, MSc., PhD.; DMV, MSc.; Nacional de Colombia.

pi et al. 1988). Por lo general algunos animales con infección persistente presentan bajos niveles de proteínas séricas, las cuales se incrementan desde el nacimiento hasta los 12 meses de edad (Guerin et al. 1992).

La infección persistente parece estar presente entre el 0.4 y 1.7% del ganado en todas las edades (Baum et al. 1989). Un estudio en Estados Unidos demostró que la infección persistente fue detectada en el 9% de los hatos evaluados (Baker, 1987). Dubovi (1986) realizó un estudio longitudinal en hatos seleccionados, encontrando que sobre una población de 3000 animales, 54 (1.7%) presentaron infección persistente (Dubovi, 1986).

Las formas NCPs en animales Ptieneen especial *tropismo* por los leucocitos sanguíneos: células mononucleares, linfocitos T y B, monocitos y células nulas (Bielefeldt, 1988). Bolin (1985), encontró que un 4.4% de todos los leucocitos son infectados con virus NCP en ganado con infección persistente (Guerin et al. 1992). La replicación viral también puede ocurrir en ciertos tejidos no linfoides y no epiteliales, tal como el sistema nervioso central, en cuyas neuronas se propone la existencia de un receptor específico para VDVB (Hewicker et al. 1990).

Otro fenómeno de interés en la patogénesis de la enfermedad es el desencadenamiento de la patología conocida como la Enfermedad de las Mucosas (EM), descrita por primera vez por Ramsay y Chivers en 1953, la cual se caracteriza por diarrea profusa e intensa, emaciación, lesiones ulcerativas del tracto gastrointestinal y una mortalidad cercana al 100%. Para explicar el desarrollo de esta entidad se han propuesto varias teorías siendo la más aceptada, la que designa a los animales persistentemente infectados como los más susceptibles a sufrir una superinfección con una cepa CP homóloga a la que les ocasionó la inmunotolerancia; en estos animales la eliminación viral es baja; demostrado por los escasos niveles de virus encontrados en las heces de los bovinos infectados (Bielefeldt y Babjuk, 1988).

En Colombia, Parra (1994) encontró la coexistencia de reactividades serológicas para VDVB, leucosis bovina y *Lepospira hardjo*, revelando el impacto económico sobre la producción bovina, representado especialmente en un incremento en los días abiertos y los servicios por concepción.

Para el diagnóstico del VDVB, recientemente se han desarrollado métodos inmunohistoquímicos tendientes a detectar la presencia de antígenos en cultivos celulares y en secciones de tejidos criopreservados (Bielefeldt y Bloch, 1982; Meyling y Jensen, 1988). Ward et al. (1984), conjugaron un antisuero específico eluido por una columna inmunoabsorbente con una peroxidasa de rábano, con el objeto de detectar cepas de VDVB en tejidos procesados para microscopía de luz y electrónica.

MATERIALES Y METODOS

La presente investigación para su desarrollo se dividió en dos fases: La primera constituyó un estudio serológico para el VDVB en 3 fincas distribuidas en la Sabana de Bogotá, teniendo como referencia el banco de sueros del Posgrado en Salud y Producción Animal de la Universidad Nacional de Colombia (Parra, 1994). Con base en los resultados obtenidos se estableció una segunda fase tendiente a buscar la posible presencia de animales persistentemente infectados en nuestro medio.

Los predios estudiados se encontraron en dos subzonas dentro de la Sabana de Bogotá, así: los predios 1 y 3 en el municipio de Mosquera y el 2 en el municipio de Sibabó. Dos de las fincas pertenecen a entidades estatales y el otro es un predio privado; todos tienen por actividad principal la producción de leche con bovinos Holstein, no inscritos en la asociación nacional de la raza.

Una vez terminado el estudio serológico, se procedió a adelantar la fase 2 de la investigación, para ello se escogieron los animales que presentaron a través de las 12 serologías títulos SN negativos o no superiores de 1:8.

Con el objeto de estandarizar las pruebas diagnósticas para detectar los animales persistentemente infectados con el VDVB y contar con un control positivo, se produjeron anticuerpos específicos al virus

en conejos siguiendo un esquema de inoculación largo empleando virus inactivado en Adivuyente Incompleto de Freund (AIF)(SIG-MA¹) (Barta, 1988), luego del cual se realizó sangría en blanco de los animales y se procedió a purificar los anticuerpos por medio de cromatografía de afinidad empleando proteína A sepharosa CL-4B (SPA-SEPHAROSA[®] PHARMACIA), (Muyildermans et al. 1993).

En las tres fincas estudiadas, se evaluaron 23 animales (entre seropositivos y seronegativos). Siguiendo el orden de finca (1, 2 y 3), estos animales fueron numerados del 1 al 23, aquellos que fueron seropositivos en el estudio previo se identificaron con el símbolo (+), y se usaron como controles positivos de las diferentes pruebas.

Teniendo en cuenta la afinidad del VDVB por las células polimorfonucleares, especialmente las cepas NCP, se intentó estandarizar una prueba diagnóstica a partir de este tipo celular. Para este fin se realizó la separación del paquete celular mediante el empleo de un gradiente de densidad (ficoll-hypaque) siguiendo el procedimiento de Corapi et al. (1989) y Larsson et al. (1990). La sangre de cada animal fue suspendida en el gradiente y centrifugada por 30 minutos a 1000xg, posteriormente se hizo extracción del paquete celular y éstas se lavaron tres veces en medio RPMI-1640 a 300xg.

Una vez separadas las células PMN se hizo recuento celular y se fijaron en laminas portaobjetos a una concentración de 8×10^6 células/ml y se almacenaron a -20°C, este procedimiento se denominó como *precultivo de linfocitos*.

Otra porción de células PMN se tomó a una concentración de 1.5×10^6 células/ml y se cultivó en medio medio RPMI 1640 suplementado con glutamina, penicilina, estreptomina y phytohemaglutinina A (Larsson et al. 1990). Las células se sembraron en cajas de microtécnica de 24 pozos y se incubaron a 37°C por 96 horas en atmósfera al 5% de CO₂ (Baum et al. 1989; Bielefeldt y Bloch, 1982). Transcurridas las 96 horas se recuperaron las células y se fijaron de la misma manera que en el procedimiento anterior. A esta técnica se le dio el nombre de *cultivo de linfocitos*.

Otra técnica empleada fue la de *cultivo de sangre*, en la cual se tomaron 0.5 ml de sangre periférica completa heparinizada y se cultivó en RPMI 1640 por 72 horas a 37°C, posteriormente se recuperaron las células PMN y se fijaron.

Para realizar aislamiento viral se estandarizó la prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IPI) sobre células linfoides; esta técnica se aplicó a los tres procedimientos mencionados. El protocolo usado fue una modificación del propuesto por Haines et al. (1992): La fijación de las células se hizo con una solución de metanol al 2.5% (Allan et al. 1989; Bielefeldt et al. 1981; Hewicker et al. 1990). Las células se lavaron 5 veces con buffer de lavado y se adicionó el primer anticuerpo, se dejó en incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente por 30 minutos; luego se hicieron 3 lavados cada uno de ellos de 5 minutos. Posteriormente se adicionó proteína G recombinante (Immunopure, PIERCE, 1991) y se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente por 30 minutos; seguidamente se lavó 3 veces y se reveló con el sustrato (AEC) por 10 minutos, deteniendo la reacción con agua destilada.

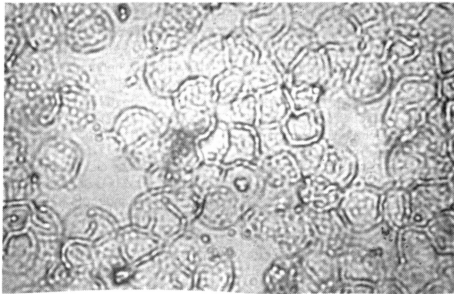
La prueba de IPI se desarrolló empleando anticuerpos específicos anti VDVB CP y NCP producidos en conejos; también se empleó un suero positivo de campo como control.

La lectura de las láminas se hizo en microscopio dé luz (Lietz[®]) con objetivo 40X. De cada siembra se observaron y evaluaron 4 campos microscópicos; dentro de cada campo 30 células aproximadamente y se promediaba la cantidad que mostraban positividad. Para la evaluación se usó la escala colorimétrica empleada por Coopers et al. (1993), por medio de la cual se establecen reacciones negativas (-) cuando no hay reacción; intermedias (+) cuando reacciona entre el 50 y 70% de las células, e intensas (++) por encima del 70% (Figuras 1 y 2).

RESULTADOS Y DISCUSION

Precultivo de linfocitos

Por medio de esta prueba se hizo manifiesto el alto grado de reconocimiento al virus de DVVB por los anticuerpos específicos. Se en-

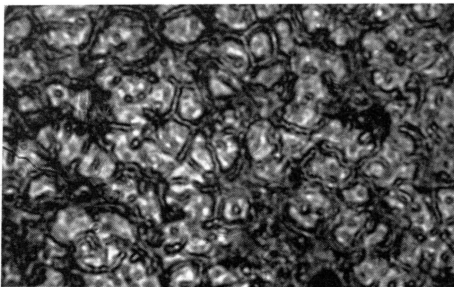


inmunoperoxidasa negativa a VDVb en linfocitos

contró un reconocimiento intenso del 52,17% e intermedio del 34,78% al emplear el anticuerpo anti CP; mientras que con el NCP el reconocimiento intenso fue del 26,08%. Lo anterior demuestra como la detección de las partículas virales fue inferior al usar el Ac anti NCP (Figura 3).

Es importante señalar como usando este procedimiento, tres bovinos (4,17,20) no reaccionaron, llevando a pensar que fuesen absolutamente negativos.

Mientras que 20 animales mostraron reacciones positivas (tonalidad marrón) usando el Ac anti-CP, 18 de los mismos fueron reconocidos también como positivos por el Ac anti-NCP, indicando una homología en la capacidad de reconocimiento del VDVb por parte de ambos anticuerpos del 89%; este resultado confirma el reconocimiento cruzado que hay para los dos biotipos, los cuales comparten epitopes que son detectados por ambos tipos de anticuerpos; lo an-



inmunoperoxidasa positiva a VDVb en linfocitos

reacción intermedia generando un margen de duda muy bajo.

El anticuerpo NCP reconoció de forma intensa la presencia viral en el 56,52% de los casos, siendo superior al precultivo, esto lleva a sugerir que el cultivo de linfocitos y su estimulación mitogénica facilita la detección viral.

Con esta técnica en todos los animales seropositivos se ratificó la presencia viral, con la ventaja que la proporción de reacciones intensas fue más notoria llevando a una buena discriminación entre infectados y no infectados.

Nuevamente se determinó la capacidad de reconocimiento cruzado entre los anticuerpos a las cepas CP y NCP. Además de esta reacción, se debe tener en cuenta que en animales seropositivos esta respuesta puede deberse a la presencia simultánea de cepas CP y NCP heterólogas, y por tanto el reconocimiento por parte de los anticuerpos se amplía. El concepto anterior puede tener validez bajo una de las teorías de presentación de la enfermedad de las mucosas, la que señala como la patología se produce solamente si hay conjunción de dos biotipos homólogos; para el presente caso sería la presencia de los dos biotipos sin que necesariamente se produzca el cuadro letal, lo cual estaría de acuerdo con Bielefeldt et al. (1989).

El suero de campo positivo también reconoció la presencia viral, siendo intensa en el 60% de los casos, aunque nunca alcanzó los niveles de reconocimiento de los anticuerpos purificados, esto muestra la ventaja en términos de especificidad que se alcanza al trabajar este tipo de pruebas con anticuerpos anti virus específico.

El hecho que cerca de la mitad de la población seronegativa fuera reconocida como positiva a la presencia viral por parte del Ac anti-NCP indica sin duda la presencia de animales infectados con cepas NCP en nuestros hatos, los cuales hasta el momento no se habían diagnosticado, descubriéndose por tanto el gran eslabón en la epidemiología de la enfermedad, como son los animales diagnosticados como negativos por la prueba rutinaria de seroneutralización y que están diseminando partículas virales al medio.

Los resultados encontrados usando esta técnica la señalan como un buen elemento diagnóstico para determinar ausencia viral en animales seronegativos o por el contrario corroborarla especialmente en aquellos donde los títulos seroneutralizantes (1:16; 1:32) pongan en duda la presencia del VDVb.

Cultivo de sangre

El principal inconveniente encontrado usando este procedimiento fue el bajo rendimiento celular comparado con el procedimiento anterior.

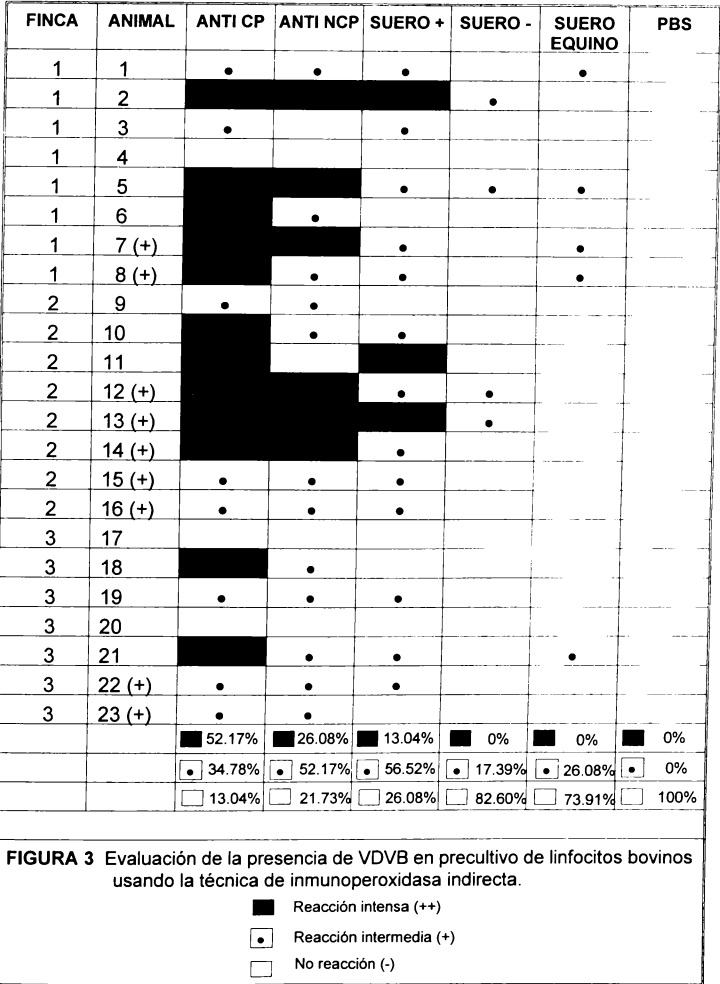
El anticuerpo anti CP reconoció de forma intensa la presencia viral en el 60% de los casos, 17% de forma intermedia y 11,17% no se pudo leer (Figura 5).

A pesar de los inconvenientes en la lectura, los animales seropositivos ratificaron presencia viral coincidiendo con las dos técnicas anteriores, pero la capacidad de reconocimiento fue inferior comparándola con el cultivo de linfocitos, pero superior al precultivo, lo cual confirma la importancia del estímulo mitogénico sobre al activación de la replicación viral in vitro.

En el grupo de animales seronegativos, se demostró presencia viral en el 60% usando al Ac anti CP, mientras que usando el anti CP fue del 55%; lo cual ratifica nuevamente la presencia de animales inmunotolerantes persistentemente infectados en nuestro medio.

Al hacer un análisis comparativo de los resultados obtenidos con los tres procedimientos empleados en el presente estudio, se pudo establecer que en el predio 1, los bovinos 2 y 5 (seronegativos por más de un año) mostraron presencia viral usando las tres técnicas, señalándolos como inmunotolerantes. Mientras que el bovino 4 no mostró reacción y por tanto fue diagnosticado como negativo.

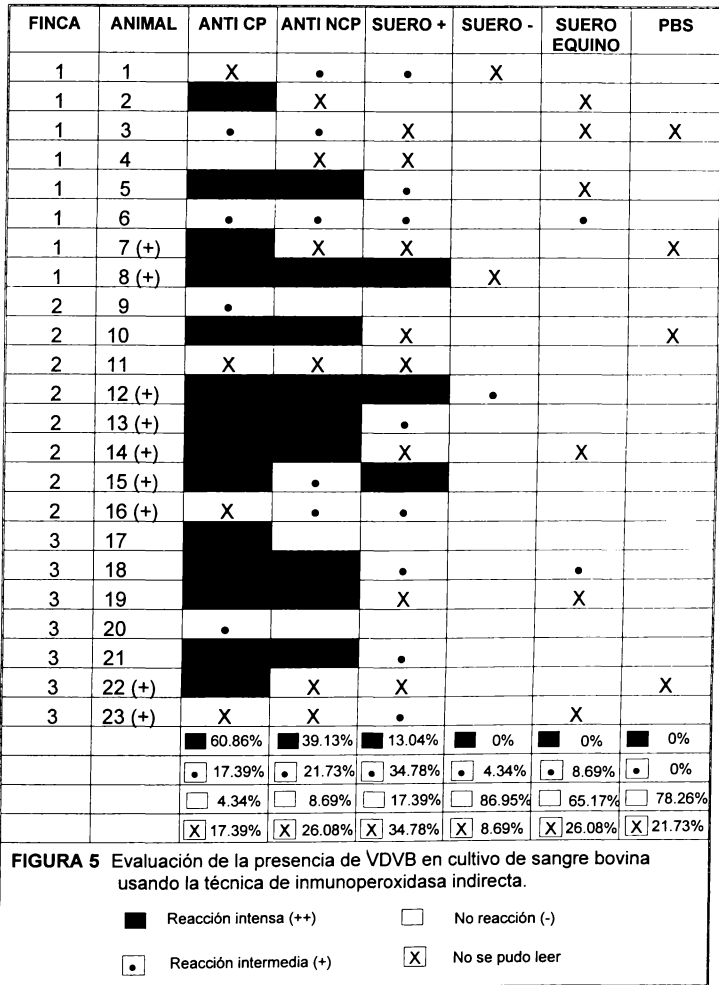
En el predio 2, la asociación con la prueba de seroneutralización fue perfecta, ya que los animales clasificados como seronegativos en el estudio serológico previo, antes de iniciar la fase 2 habían seroconvertido y manifestaron presencia viral en todos los cultivos de linfocitos.



FINCA	ANIMAL	ANTI CP	ANTI NCP	SUERO +	SUERO -	SUERO EQUINO	PBS
1	1	■	■	●		●	
1	2	■	■	■	●	●	
1	3	●	●	●			
1	4	●	●	■	●		
1	5	■	■	■		●	
1	6	■	●	●			
1	7 (+)	■	■	■	●	●	
1	8 (+)	■	■	■	●	●	
2	9	■	●	●			
2	10	■	■	■			
2	11	■	●	■			
2	12 (+)	■	■	●			
2	13 (+)	■	■	■			
2	14 (+)	■	■	■	●	●	
2	15 (+)	■	●	■			
2	16 (+)	■	■	●			
3	17	■	●	■			
3	18	■	●	●		●	
3	19	■	■	■			
3	20	●	●	■			
3	21	■	■	■			
3	22 (+)	■	■	■		●	
3	23 (+)	■	●	●			
		■ 82.6%	■ 56.52%	■ 52.17%	■ 0%	■ 0%	■ 0%
		● 13.04%	● 43.47%	● 34.78%	● 26.08%	● 47.82%	● 0%
		□ 4.34%	□ 0%	□ 13.04%	□ 73.91%	□ 52.17%	□ 100%

FIGURA 4 Evaluación de la presencia de VDVB en cultivo de linfocitos bovinos usando la técnica de inmunoperoxidasa indirecta.

- Reacción intensa (++)
- Reacción intermedia (+)
- No reacción (-)



Para el predio 3, en los bovinos 18, 19 y 21 (seronegativos), también se identificó la presencia viral, haciéndolos PI. Los animales 17 y 20 no reaccionaron y se declararon como libres de DVB.

Los resultados por fincas demuestran como en nuestros hatos se presenta una de las características más reportadas para la DVB, como es la convivencia bajo el mismo habitat de animales seropositivos, persistentemente infectados y libres; siendo esta distribución "típica" de la enfermedad, uno de los mayores enjambres dentro de la patogénesis de la misma.

CONCLUSIONES

Con la presente investigación se ratificó como el VDVB, y en

especial el biotipo NCP, tiene afinidad por las células linfoides, las cuales por su capacidad de multiplicación in vitro constituyen un buen elemento de trabajo para realizar aislamientos virales.

La técnica de cultivo de linfocitos usada para detectar animales persistentemente infectados con el VDVB mostró las mayores ventajas siendo la alta asociación con las pruebas serológicas y la posibilidad de distinguir animales positivos a la presencia viral las más relevantes.

Empleando la técnica de cultivo de linfocitos, más de la mitad de población seronegativa evaluada fue positiva a la presencia viral, lo que constituye el primer reporte para al país de animales immuno-

tolerantes persistentemente infectados con el VDVB.

La técnica de cultivo de linfocitos se debe realizar con la suplementación de mitógenos, estos al activar la proliferación celular también activan la replicación viral facilitando la detección de las partículas. El tiempo óptimo de cultivo para el diagnóstico de animales PI se estableció en 96 horas.

Se ratificó la reacción cruzada que hay entre los dos biotipos virales, las cuales se evidencian por el reconocimiento que hay de los dos virus utilizando anticuerpos específicos, especialmente contra cepas CP.

Las técnicas de pre-cultivo de linfocitos y cultivo de sangre no fueron los más apropiados para la

detección de VDVB, se recomienda para su aplicación la realización de modificaciones aumentando la concentración celular para el primer caso y el volumen de sangre cultivada para el segundo.

Una característica encontrada en los cultivos de células PMN de animales persistentemente infectados es que difícilmente muestran reacciones intensas a la prueba de IP, hecho que se puede adjudicar a la baja concentración viral, propia de estos animales. Por lo anterior se recomienda que esta sea parte de un conjunto de técnicas orientadas a declarar a un animal PI. Otras técnicas recomendadas forman parte de otra entrega del presente reporte y son: ELISPOT y ELISA.

BIBLIOGRAFIA

- ALLAN, G. H.; Mc NULTY, M. S.; BRYSON, D.; MACKIE, D. W.; PLATTEN, M. 1989. Demonstration of bovine virus diarrhoea virus antigen in formalin fixed, paraffin embedded tissue using a streptavidin/biotin technique. Research in Veterinary Science. 46: 416-418.
- ATLURU, D.; GUDAPATY, S.; XUE, W.; GURRIA, F.; CHENGAPPA, H. M.; Mc VEE, D. S.; MINOCHA, H. C. & ATLURU, S. 1992. In vitro inhibition of 5-lipoxygenase metabolite leucotriene B₄ in bovine mononuclear cells by bovine viral diarrhoea virus. Veterinary Immunology and Immunopathology. 31: 49-59.
- BAKER, J. C. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: A review. Journal of American Veterinary Medical Association JAVMA. 190(11): 1449-1457.
- BARBER, D. H. L.; NETTLETON, P. F. & HERRING, J. A. 1985. Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. Veterinary Record. 17: 459-464.
- BARTA, O. 1988. Laboratory techniques of veterinary clinical immunology. Charles C. Thomas Publisher. 31-42.
- BAUM, K. H.; PERRY, B. D.; LES-SARD, P.; DUBOVI, E. J.; HUNTER, W. S. & HOOKE, R. L. 1989. Epidemiology of bovine viral diarrhoea - mucosal disease in beef cattle. Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian. 11(9): 1147-1157.
- BENNETT, R. M. & DONE, J. T. 1986. Control of the bovine pestivirus syndrome in cattle: A case for social cost-benefit analysis? In: Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine. Proceedings (Edinburgh). 55-65.
- BIELEFELD OHMANN, H. 1988. BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: implications for the pathogenesis of clinically fatal disease. Acta Veterinaria Scandinavica. 29(1): 77-84.
- BIELEFELD OHMANN, H. & BABIUK, L. A. 1988. Influence of interferons alpha 1 and gamma of tumor necrosis factor on persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in vitro. Journal of General Virology. 69:1399-1403.
- BIELEFELD OHMANN, H. & BLOCH, B. 1982. Electron Microscopic studies of bovine viral diarrhoea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. Arc. Virol. 71:57-74.
- BIELEFELD OHMANN, H.; HOLM JENSEN, M.; SORENSSEN, K. J. & DALSGAARD, K. 1981. Demonstration of bovine viral diarrhoea virus antigen in cryostat and paraffin-immunoperoxidase technique. Acta Path-Microbiol. Scand. Sect. 89: 281-285.
- BIELEFELD OHMANN, H.; RONSHOLT, L. & BLOCH, B. 1987. Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. Journal of General Virology. 68: 1971-1982.
- BOLIN, S. R. 1985. Persistent infection of cattle with BVD virus: recent findings on origin, prevalence and relationship to disease. Proc-Annu-Conv-Am Assoc-Bovine-Pract-Stillwater, Oklahoma: The Association (17th). 67-69.
- CLARKE, M. C.; BROWNLEE, J. & HOWARD, C. J. 1986. Isolation on cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from tissues of infected animals. Amer. Assn. Veterinary Laboratory Diagnosticians. 29th Annual Proceedings. 3-12.
- COLLETT, M. S. 1992. Molecular genetics of pestiviruses. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 15(3): 145-154.
- COLLETT, M. S.; LARSON, R.; BELZER, S. K. & RETZEL, E. 1988. Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. Virology. 165: 200-208.
- COOPENS, M. T.; DHONT, M. A.; DEBOEVER, J. G.; SERREYN, R. F.; VANDERKERCHEMME, D. A. & ROELS, H. S. 1993. The distribution of oestrogen and progesterone receptors in the human endometrial basal and functional layer during the normal menstrual cycle. Hystochemistry. 99: 121-126.
- CORAPI, W. V.; DONIS, R. O. & DUBOVI, E. J. 1988. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. Journal of Virology. 62: 2823-2827.
- CORAPI, W. V.; FRENCH, T. W. & DUBOVI, E. J. 1989. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. Journal of Virology. 63(9): 3934-3943.

- DUBOVI, E. J. 1986. Fatal BVD virus-induced disease: role of persistently infected animals. *The Bov Proc.*(18).
- _____. 1990. Molecular biology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9(1):105-114.
- ERNST, P. B.; BAIRD, J. D. & BUTLER, D. G. 1983. Bovine viral diarrhoea: an update. *The Compendium on Continuing Education.* 5(11): 5581-5589.
- FERNELIUS, A. L.; AMTOWER, W. C.; LAMBERT, G.; Mc CLURKIN, A. W. & MATTHEWS, P. J. 1973. Bovine viral diarrhoea virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. *Can. J. Comp. Med.* 37: 13-20.
- GRIFFITHS, I. B.; GALLEGO, M. I.; VILLAMIL, L. C. 1982. Factores de fertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia. *ICA.* 120-122.
- GUERIN, B.; LE GUIENNE, B. M.; ALLIETTA, M. & THIBIER, M. 1992. IVF and in culture of bovine embryos using semen from a bull persistently infected with BVD.
- HAINES, D. M.; CLARK, E. G. & E. J. DUBOVI. 1992. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet. Pathol.* 29: 27-32.
- HEWICKER, M.; WORHRMANN, T.; FERNANDEZ, A.; TRAUTWEIN, G.; LIESS, B. & MOENING, V. 1990. Immunohistological detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology.* 23: 202-210.
- HOOFVt van IDEKINGE, B. L. L.; van WAMEL, L. L. B.; van GENNIP, H. G. P. & MOORMANN, R. J. M. 1992. Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhoea virus infection in cattle. *Veterinary Microbiology.* 30:21-34.
- JENSEN, J. & SHULTZ, R. D. 1991. Effect of infection by viral diarrhoea virus (BVDV) in vitro on interleukin-1 activity of bovine monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 29: 251-265.
- KELLING, C. L.; STINE, L. C.; RUMP, K. K.; PARKER, R. E.; KENNEDY, J. E.; STONE, S. T. & ROSS, G. S. 1990. Investigation of bovine viral diarrhoea virus infections in a range beef cattle herd. *Journal of American Veterinary Medical Association JAVMA.* 197(5): 589-593.
- KELLING, C. L.; KENNEDY, J. E. et al. 1991. Monitoring bovine viral diarrhoea virus vaccines for adventitious virus, using T1 ribonuclease finger RNA oligonucleotide viral RNA. *Am J Vet Res.* 52 (8): 1237-1244.
- KWANG, J.; LITLEDIKE, E. T.; BOLIN, S. & COLLET, M. S. 1991. Efficiency of various cloned DNA probes for detection of bovine viral diarrhoea viruses. *Veterinary Microbiology.* 28: 279-288.
- LARSSON, B.; FOSSUM, C. & JUNTTI, N. 1990. In vitro production of antibodies to bovine virus diarrhoea virus by peripheral blood mononuclear cells from cattle immunized by infection. *Veterinary Immunology.* 22:161-170.
- MAGAR, R. & LECOMTE, J. 1987. Comparison of methods for concentration and purification of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol Meth.* 16: 271-279.
- MENDIAGAÑA, C. T. 1994. Caracterización de proteínas y comportamiento antigénico del virus de la diarrea viral bovina (VDVB). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- MEYLING, A. & JENSEN, M. 1988. Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently infected bull. *Veterinary Microbiology.* 17: 97-105.
- MOENING, V. 1990. Pestiviruses: a review. 1990. *Veterinary Microbiology.* 23: 35-54.
- MUYILDERRMANS, G.; CAIJ, A.; De SMET, A.; KOENEN, F. & HAMERS, R. 1993. Characterization of structural and non-structural proteins of hog cholera virus by means of monoclonal antibodies. *Arch Virol.* 131: 405-417.
- NAGELE, M. J.; 1984. Outbreak of mucosal disease among apparently immunotolerant heifers. *The Veterinary Record.* 115: 496-499.
- NETTLETON, P. F.; HERRING, J. A.; SINCLAIR, J. A. & QUIRIE, L. 1986. The epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine. Proceedings.* Edinburgh. 2nd-4th April: 42-53.
- PARK, B. 1991. Studies on viral polypeptide processing by bovine viral diarrhoea virus. Thesis of Master of Science. Iowa State University. 1-12.
- PARRA, J. L. 1994. Influencia de la infección por diarrea viral bovina y de la coinfección con VLB, *Leptospira hardjo* e IBR sobre la producción en ganado de leche. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- PETERS, W.; LIESS, B.; FREY, H.R. & TRAUTWEIN, G. 1987. Incidence and impact of persistent infections with BVD in the field. *Pestivirus Infections of Ruminants/Edited by J. W. Harkness.* Luxembourg: Commission of the European Communities. 133-145.
- POCOCK, D. H.; HOWARD, C. J.; CLARKE, M. C. & BROWNLEE, 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.
- POTTS, B. J.; SAWYER, M.; SHEKARCHI, I. C.; WISHER, T. & HUDDLESTON, D. 1989. Peroxidase-labeled primary antibody method for detection of pestivirus contamination in cells cultures. *Journal of Virological Methods.* 26: 119-124.
- RAMIREZ, M. C. 1993. Evaluación de cultivos celulares y suero fetal bovino inactivado con BEI en el estudio del virus de la diarrea viral bovina (DVB). Tesis de Magister Science. Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Colombia.
- ROEDER, P. L. & DREW, T. W. 1984. Mucosal disease of cattle: a late sequel to fetal infection. *Veterinary Record.* 114:309-313.
- ROTH, J. A.; BOLIN, S. R. & FRANK, D. E. 1986. Lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in cattle persistently infected with BVDV. *Am J Vet Res.* 47(5): 1139-1144.
- TARRY, D. W.; BERNAL, L.; EDWARDS, S. 1991. Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Vet Record.* 128: 82-84.
- TERPSTRA, C. & WENSVOORT, G. 1988. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Research in Veterinary Science.* 45: 137-142.
- WARD, A. C. S. & KAEBERLE, M. L. 1984. Use of an immunoperoxidase strain for the demonstration of bovine viral diarrhoea virus by light and electron microscopies. *American Journal of Veterinary Research.* 45(11): 165-170.
- WESTENBRINK, F.; STRAVER, P. J.; KIMMAN, T. G. et al. 1989. Development of a neutralising antibody response to an inoculated cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Record.* 125: 262-265.