

Detección de biotipos del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) a través de RT-PCR¹

Hernán Burbano C. * / Víctor Julio Vera A. ** / Gloria Ramírez N. ***

RESUMEN

En el presente artículo se describe la normalización de la prueba de RT-PCR para ser empleada como herramienta en la detección del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB). Los iniciadores utilizados amplificaron un sector de 280 pb que se encuentra dentro del extremo 5' UTR del genoma viral. Para el proceso de normalización, se usó como control positivo, cepas de referencia de VDVB (NADL, Osloss). Para evaluar reacción cruzada se usó una cepa de virus de Enfermedad de las Fronteras (BD). La obtención del cDNA se realizó por el método de «*random primers*» (iniciadores aleatorios). La prueba detectó tanto cepas citopáticas, como no citopáticas del VDVB. El protocolo establecido demostró un buen funcionamiento *in vitro* y es la base para posteriores pruebas de validación y evaluación de la prueba diagnóstica.

Palabras clave: DVB, RT-PCR, diagnóstico molecular.

DETECTION OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS BIOTYPES THROUGH RT-PCR

ABSTRACT

This paper describes the standardization of a reverse transcription (RT) polymerize chain reaction (PCR) in order to be used as a tool to detect the bovine viral diarrhea virus (BVDV). The primers employed amplified a sector of 280 bp that is in the 5' UTR region of the viral genome. The VDVB NADL and Osloss strains were used as positive controls for the standardization process. In order to evaluate cross-reaction a strain of border disease (BD) was utilized. The cDNA was obtained using the random primers method. The RT-PCR detected cytopathic as well as non-cytopathic biotypes of BVDV. The standardized protocol showed a good performance *in vitro* and it is the bases for evaluation and validation essays of this diagnostic test.

Key Words: DVB, RT-PCR, molecular diagnostic.

¹ Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Genética, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá.

* Médico Veterinario, Programa Maestría en Ciencias Biológicas, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Correo electrónico: hab86@hotmail.com

** Doctor en Medicina Veterinaria, MSc, PhD; Profesor Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

*** Médico Veterinario, MSc. Profesor Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

Fecha de recepción: 11 de mayo de 2005.

Fecha de aprobación: 21 de julio de 2005.

INTRODUCCIÓN

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) ha sido un enigma para la medicina veterinaria desde su primera descripción formal en 1946 (Olafson, 1996). Este virus se ha convertido en uno de los agentes patógenos más importantes para la producción pecuaria mundial (Jaime *et al.*, 1996), debido a que está distribuido en las poblaciones de ganado bovino de gran parte de los países del mundo (Tremblay, 1996). Los reportes internacionales muestran que más del 50% de la población bovina es seroreactora al agente (Jaime, 1996). Las pérdidas en la producción debido a la infección con VDVB son resultado de la inmunosupresión, problemas reproductivos (repetición de servicios, aborto, momificación) y muerte por enfermedad de las mucosas (Kelling, 1996). Su impacto económico es el suficiente para justificar programas de erradicación en muchos países (Tremblay, 1996).

La Diarrea Viral Bovina (DVB) es una enfermedad infecciosa causada por un virus miembro del género *Pestivirus*, de la familia *Flaviviridae* (Collet, 1991, 1992, 1996). Inicialmente fue reconocido como el agente causal de una enfermedad gastrointestinal, ahora se sabe que el virus infecta casi todos los órganos; con particular tropismo en los sistemas inmunológico y reproductivo (Tremblay, 1996). Las infecciones con VDVB pueden resultar en un amplio rango de manifestaciones clínicas que van desde infecciones subclínicas a una forma fatal conocida como enfermedad de las mucosas (Baker, 1995).

Desde la década de los 80s se ha establecido una gran reactividad a la enfermedad en nuestras ganaderías (Griffiths *et al.*, 1982). Posteriormente, en estudios realizados sobre las principales enfermedades reproductivas en toros, se encontró que la DVB presentó un alto porcentaje de reactividad (83%) en el país (Góngora *et al.*, 1995).

Las infecciones *in utero* pueden llevar a muerte fetal y aborto, como también pueden generar terneros aparentemente normales, pero Persistentemente Infectados (PI). Estos animales PI no solo están en alto riesgo de desarrollar la enfermedad de las mucosas, sino que también son un gran problema debido a la eliminación constante del virus, afectando esto de forma negativa el control y la prevención de las infecciones con VDVB, debido a que los animales PI son inmunológicamente tolerantes (Gustad, 1993) y se convierten en los mayores diseminadores, constituyéndose en un mecanismo por medio del cual el virus perdura en la naturaleza. En el país se ha demostrado la presencia de animales inmunotolerantes PI con VDVB (Jaime *et al.*, 1996). La identificación y erradicación de terneros persistentemente infectados junto con el establecimiento de programas de vacunación, son estrategias esenciales para el control del VDVB (Hamel *et al.*, 1995), incluso existen modelos que indican que el diagnóstico y eliminación oportuna del hato de animales PI disminuyen el porcentaje de cobertura vacunal necesaria para un adecuado programa de control y prevención de la DVB (Cherry *et al.*, 1998).

Debido a la complicada patogénesis de la infección con VDVB, el diagnóstico de laboratorio es un importante componente en la prevención y el control de la infección (Brock, 1995). Los protocolos usados para la detección del VDVB usan la combinación de cultivos celulares e inmunofluorescencia. El problema de estos protocolos es que presentan resultados falsos positivos debido a que el VDVB es un contaminante usual del suero fetal bovino y de los cultivos celulares (Abraham, 1993; Ramírez *et al.*, 1994b; Bolin, 1998; Hamel *et al.*, 1995).

Además de esto, el trabajo con los cultivos celulares es laborioso y requiere de varios días para obtener un resultado, lo que impide que los laboratorios puedan procesar un gran número de muestras simultáneamente (Hamel *et al.*, 1995). La detección

por microscopía electrónica es más rápida pero tiene menor sensibilidad que los cultivos celulares y un resultado concluyente es difícil debido a la morfología variable del virus (Hamel *et al.*, 1995).

Recientemente se han diseñado técnicas moleculares para el diagnóstico del VDVB, dentro de estas una de las pruebas con mayores perspectivas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Brock, 1995). Las pruebas diagnósticas moleculares detectan directamente el RNA genómico viral. Estos métodos tienen ventajas sobre el aislamiento viral debido a que no presentan interferencias con anticuerpos neutralizantes y así no se ve afectada la sensibilidad y especificidad de la prueba (Hamel *et al.*, 1995). También se puede detectar no sólo RNA infectivo, sino también virus defectuosos e inactivados (biológicamente no infectivos) (Hamel *et al.*, 1995).

En Colombia, el diagnóstico de VDVB se ha llevado a cabo mediante seroneutralización y pruebas inmunoenzimáticas; no obstante es necesario normalizar pruebas moleculares como el RT-PCR, ya que esto haría posible la realización de un diagnóstico con una muy alta sensibilidad y especificidad que incluiría a los animales PI, haciendo posible la realización de programas de control y prevención detectando dichos individuos. Así mismo, hace posible el desarrollo de futuras investigaciones en cuanto a genotipificación viral, que permitirían la caracterización molecular de cepas colombianas. En el presente estudio se describe el proceso de normalización de la prueba de RT-PCR para detección del VDVB.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Genética y en el postgrado en Salud y Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

Cepas empleadas. Se utilizaron cepas de referencia suministradas por el Dr. Stefan Vilcek, University of Veterinary Medicine, Kosice, Eslovaquia. Las cepas utilizadas fueron: VDVB NADL, VDVB Osloss, BD (Border Disease). El material fue enviado como material biológico inerte mezclado con Trizol (130 µl de muestra y 460 µl de Trizol). También se utilizaron líneas de cultivos celulares: células MDBK, FLK y una línea celular de córnea bovina desarrollada en el postgrado de Salud y Producción animal. Los cultivos celulares fueron suplementados con suero fetal bovino certificado como libre del VDVB. Como control negativo se usó una mezcla que contenía todos los reactivos usados en el experimento en sus mismas concentraciones y cantidades, con la excepción de la muestra de ácido nucleico; el cual fue remplazado por H₂O-DEPC.

Extracción del RNA. Todo el material utilizado durante la extracción del RNA y el desarrollo del RT-PCR fue tratado con agua dietil-piro-carbomato (DEPC) con el fin de proporcionar material libre de RNAsas (Burlenson *et al.*, 1992).

La extracción del RNA se realizó con una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Esta solución es una mejora al método desarrollado por Chomezynsky y Sacchi. El producto usado fue TRIZOL® para muestras líquidas (GIBCO BRL) (Barrera, AÑO; Corredor, 2000; Fulton *et al.*, 1999; Vilcek, 2002). Las muestras se mezclaron con TRIZOL® en relación 2:3 (200 µl de muestra y 300 µl de Trizol), luego se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 12000 g (10000 r.p.m rotor Beckman JA-18,1) por 10 minutos, 4°C, en centrífuga refrigerada Beckman J2-21.

Al sobrenadante de cada muestra se le adicionó 100 µl de cloroformo (0,2 ml de cloroformo x ml de Trizol). Después de agitación por 15 segundos se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. La

mezcla de sobrenadante y cloroformo se centrifugó 12000 g (10000 r.p.m rotor Beckman JA-18,1) por 15 minutos, 4°C, en centrífuga refrigerada Beckman J2-21. Después de esto se retiró la fase acuosa (sobrenadante) y se adicionó 200 µl de isopropanol y 200 µl de citrato de sodio a cada muestra. Luego de hacer Vortex se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12000 g (10000 r.p.m rotor Beckman JA-18,1) por 10 minutos, 4°C, en centrífuga refrigerada Beckman J2-21. Después de descartar el sobrenadante a cada muestra se le adicionó 250 µl de etanol (0,75ml de etanol x ml de Trizol) y se realizó Vortex. El siguiente paso fue centrifugar las muestras a 7500 g (8000 r.p.m rotor Beckman JA-18,1) por 5 minutos, 4°C, en centrífuga refrigerada Beckman J2-21. Luego de descartar el sobrenadante las muestras se secaron y fueron resuspendidas en agua DEPC y almacenadas a -70°C.

Primers utilizados. Los *primers* usados amplifican zonas de la región 5'UTR del genoma viral, ésta es una de las regiones que tiene la máxima homología entre los genotipos 1 y 2 (Weinstock *et al.*, 2001; Hamel *et al.*, 1995; Drew *et al.*, 1999; Ridpath *et al.*, 1994). Se seleccionó el par de *primers* diseñados por el grupo de investigación de Ridpath (Ridpath *et al.*, 1994; 1996; 2000). Este par de *primers* amplifica un segmento de 280 pb. Los *primers* utilizados fueron los siguientes: primer izquierdo (*forward*) (5'-CATGCCCATAGTAGGAC-3'). Primer derecho (*reverse*) (5'-CCATGTGCCATGTACAG-3'). Los *primers* fueron diseñados usando el programa Primer 2, comparando las secuencias del VDVB publicadas en el GeneBank (Ridpath *et al.*, 1994).

Realización del RT-PCR. Las reacciones de RT y de PCR fueron llevadas a cabo en tubos separados. El cDNA se obtuvo utilizando la técnica de *random primers* (Vilcek, 2002; Sakoda *et al.*, 1999; Wolf, 2002) y se realizó de la siguiente forma:

Inicialmente se mezclaron los *random primers* con el RNA y 5 ml de H₂O DEPC. La mezcla se llevó al termociclador por 5 minutos a 70°C para generar la desnaturalización inicial. Después de este proceso se agregó a cada tubo 10 ml de la mezcla maestra y se llevaron nuevamente al termociclador por 1 hora a 42°C.

Las concentraciones de los reactivos utilizados en la RT fueron las siguientes: *random primers* (10 ng/µl), buffer MMLV (1X), DNTPs (2mM), MMLV (0,5 U/µl) y RNAsin (0,5 U/µl). El volumen total de la reacción por tubo fue de 20 µl. El cDNA obtenido en la retrotranscripción se utilizó como plantilla para realizar la amplificación. Las concentraciones adecuadas de MgCl₂ y de *primers* se obtuvieron realizando experimentos en los que se incrementaron progresivamente las concentraciones de estos reactivos. Para encontrar la concentración óptima de MgCl₂ se probaron las siguientes concentraciones: 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM y 5 mM (Eeles y Stamps, 1994). Para los *primers* las siguientes 0,25 pM/µl, 0,5 pM/µl, 0,75 pM/µl y 1 pM/µl. La concentración a la que se usaron el resto de reactivos en la reacción de PCR fue la siguiente: buffer Taq (1X), Taq (0,025 U/µl) y DNTPs (2 mM). El volumen total de la reacción por tubo fue de 50 µl.

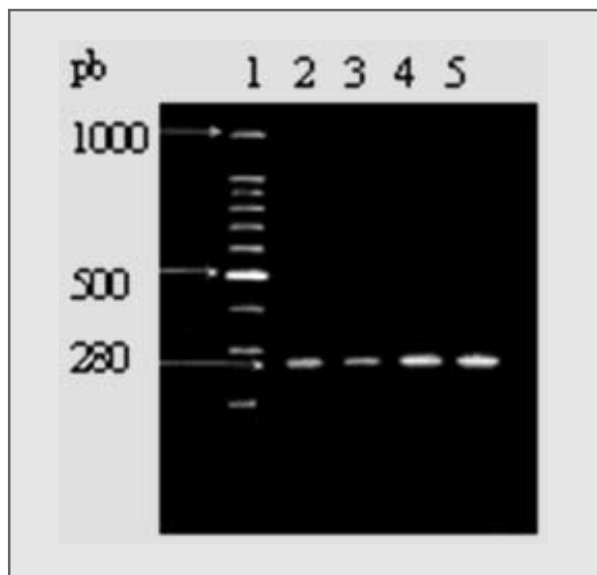
Las condiciones usadas en el programa de PCR fueron las descritas por Ridpath (Ridpath, 2000) con pequeñas modificaciones, usando un termociclador Gene Amp®, PCR System 9700, Applied Biosystems. La temperatura de anillamiento (T_{ann}) se calculó usando la siguiente fórmula (Eeles y Stamps, 1994): T_{ann} = -16,6 log(0,05) + 0,41 (%GC) + T_m-25°C Las condiciones del programa de PCR con las que se obtuvo resultados satisfactorios fueron las siguientes: 1 ciclo (94°C 5 min), 40 ciclos (94°C, 10 segundos; 53°C, 45 segundos; 72°C, 60 segundos) y 1 ciclo (72°C, 10 min).

Análisis de los productos de PCR. Los amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2%. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70 mV durante hora y media. El marcador de peso molecular usado fue: DNA en escalera 100 pb con fragmentos de pesos moleculares que se encuentran entre los 50 y 1000 pb. Los productos se visualizaron con tinción de bromuro de etidio y observación en transiluminador de rayos UV a 300 nm de longitud de onda.

RESULTADOS

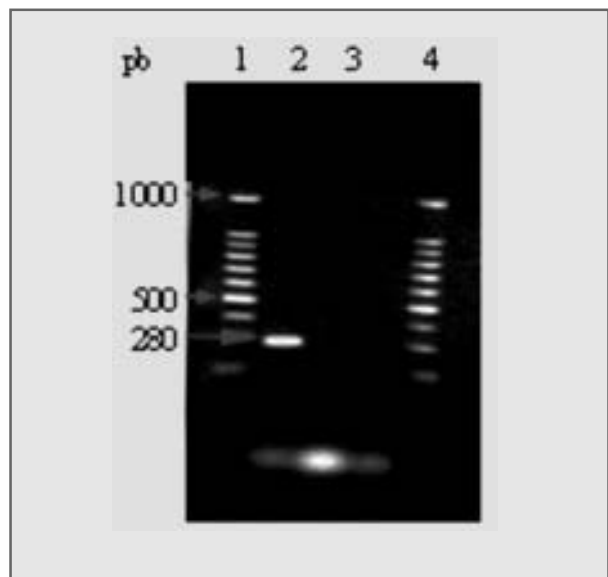
La concentración de $MgCl_2$ con la que se encontró una banda de mejor calidad fue de 4 mM. La concentración de primers con la que se evidenció menos contaminación de fondo con dímeros de primers fue de 0,75 μM (Figura 1).

FIGURA 1. NORMALIZACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PRIMERS, EMPLEANDO LA CEPA OSLOSS DEL VDVB: 1. MARCADORES MOLECULARES 2. 0,25 μM 3. 0,5 μM 4. 0,75 μM 5. 1 μM



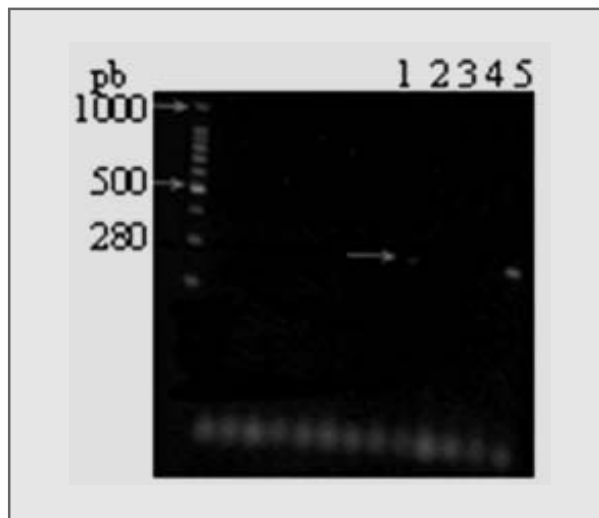
La prueba amplificó satisfactoriamente las cepas de referencia NADL, Osloss; lo que significa que bajo las condiciones empleadas en este estudio la prueba detecta como positivos los positivos. La prueba no amplificó ni la cepa de Enfermedad de las Fronteras, ni los controles negativos (Figura 2)

FIGURA 2. RT-PCR CON CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS AL VDVB: 1. MARCADORES MOLECULARES. 2. VDBV CEPA OSLOSS 3. VIRUS DE ENFERMEDAD DE LAS FRONTERAS 4. MARCADORES MOLECULARES.



Aplicando la prueba con las condiciones normalizadas en este estudio, y ya descritas en los párrafos anteriores, se observó que la línea celular MDBK estaba infectada con VDVB (Figura 3). El biotipo era no citopático, ya que al microscopio no se observaba ningún efecto citopático. De esta forma se comprobó la contaminación de ciertas líneas celulares con cepas no citopáticas del VDVB. Las células FLK y las células de córnea se encontraban libres del virus.

FIGURA 3. EVALUACIÓN DE DIFERENTES CULTIVOS CELULARES A LA PRESENCIA DEL VDVB POR LA PRUEBA DE RT-PCR. 1. CÉLULAS MDBK. 2. CÉLULAS FLK. 3. CÉLULAS CORNEA BOVINA. 4. CONTROL NEGATIVO. 5. CONTROL POSITIVO (VDVB NADL).



DISCUSIÓN

Dentro de los recientes desarrollos de técnicas moleculares para el diagnóstico del VDVB una de las pruebas con mayores perspectivas es la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Brock, 1995).

Además de ser usada como una prueba diagnóstica, el PCR ha sido usado con gran éxito en la genotipificación de cepas virales, permitiendo distinguir entre los diferentes virus pertenecientes al género *Pestivirus* (Fulton *et al.*, 1999). La información adicional al diagnóstico que permite obtener este método, es importante para la epidemiología de los pestivirus de rumiantes y también para la producción de vacunas y desafíos postvacunales (Fulton *et al.*, 1999).

El estudio realizado es un primer paso para establecer el RT-PCR como apoyo a programas de control y prevención del VDVB en el país. En Colom-

bia no se realiza actualmente seroneutralización ni aislamiento viral para VDVB, por la no disponibilidad de laboratorios calificados y por el problema de contaminación del suero fetal bovino y de las líneas celulares con cepas no citopáticas del VDVB.

La ventaja que tiene el par de *primers* escogido, es que los productos de amplificación que generan pueden ser usados para una segunda amplificación que permite genotipificar el virus (Ridpath *et al.*, 1994, 2000). Además la región del genoma escogida (5'UTR) tiene la tasa más baja de variación de secuencia al ser comparada con las secuencias de pestivirus publicadas y tiende a ser muy estable (Ridpath, 1996) Por esta razón puede ser empleada tanto para diagnóstico como para genotipificación.

La temperatura usada para la reacción de RT fue de 42°C, coincidiendo con lo descrito por algunos autores (Hamel *et al.*, 1995; Fulton *et al.*, 1999; Sakoda *et al.*, 1999) pero usando el doble de tiempo descrito por ellos, es decir 60 minutos coincidiendo en el tiempo con Ridpath y Carman (Ridpath *et al.*, 1994; Carman *et al.*, 1998).

La tasa de incorporación de nucleótidos por la Taq polimerasa es de 15 a 150 nucleótidos por segundo, pero en general se calcula que 1 minuto de polimerización es suficiente para productos de amplificación de más de 1 Kilobase (Kb) (Eeles y Stamps, 1994). Un minuto fue el tiempo para la amplificación, tiempo suficiente ya que el tamaño del amplificado es de 280 pares de bases, o sea 0,28 Kb.

Las cepas de referencia de VDVB utilizadas fueron positivas, mientras que la cepa de virus de Enfermedad de las Fronteras no amplificó, este es un indicativo de sensibilidad y especificidad de la prueba.

El ensayo realizado con las líneas de cultivos celulares demuestra una de las posibles aplicaciones de la prueba, diagnosticando si los cultivos celulares están o no infectados con VDVB no citopático.

La prueba también puede usarse para evaluar el material biológico (sueros fetales, líneas celulares) que se va a emplear en investigación y diagnóstico. El RT-PCR se puede emplear en la evaluación de fluidos procedentes de fetos abortados. Sería una

forma de evaluar el número de abortos que están asociados con el VDVB.

El resultado demostró la capacidad de la prueba para detectar cepas no citopáticas del VDVB en cultivos celulares, los cuales no presentan ningún efecto citopático. Lo anterior establece la posibilidad de detectar animales PI en programas de control y erradicación de la enfermedad (Gustad, 1993; Jaime, 1996; Kelling, 1996; Tremblay, 1996).

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, A. «*Bovine viral diarrhoea virus contamination of commercial bovine foetal serum*». *Isr. J. Vet. Med.* 48 (1993): 120-122.
- Backer, J. «*The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infections*». *The Veterinary Clinics of North America, FAP 11: 3* (1995): 425-445.
- Bolin, S. y Ridpath, J. «*Prevalence of bovine viral diarrhea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum*». *J. Vet. Diagn. Invest* 10 (1998): 135-139.
- Brock, K. «*Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections*». *The veterinary clinics of north America, FAP 11 3* (1995): 549-559.
- Burleson, F.; Chambers, T. y Wiedbrauk, D. *Virology: a laboratory manual*. EE.UU.: Academic Press, 1992.
- Carman, S. et al. «*Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995*». *J. Vet. Diagn. Invest* 10 (1998): 27-35.
- Cherry, B.; Reeves, M. y Smith, G. «*Evaluation of bovine virus control using a mathematical model of infection dynamics*». *Preventive Veterinary Medicine* 30 (1998): 91-108.
- Chomezynsky, P. y Sacchi, M. *TRIZOL Reagent, Total RNA isolation*. Life Technologies, 1987.
- Collett, M.; Wiskerchen, M.; Welniak, E. y Beltzer, S. «*Bovine viral diarrhea virus genomic organization*». *Arch. Virol. Suppl.* 3 (1991): 19-27.
- - - «*Molecular genetics of pestiviruses*». *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 15 3 (1992): 145-154.
- - - «*Genomic structure of BVDV*». *International symposium bovine diarrhea virus a 50 years review* (1996): 18-23.
- Corredor J. *Extracción del RNA por el método del TRIZOL (GIBCO BRL)*. Laboratorio Medicina Aviar ICA, 2000.
- Drew, T.; Yapp, F. y Paton, D. «*The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR*». *Veterinary Microbiology* 64 (1999): 145-154.
- Eeles, R. y Stamps, A. *Polymerase Chain Reaction (PCR) the Technique and its Applications*. EE.UU.: R.G. Landes Company Austin, 1994.

- Fulton, R. *et al.* «Nested reverse transcriptase – polymerase chain reaction(RT-PCR) for typing ruminant pestiviruses: bovine viral diarrhea viruses and border disease virus». *Can J.Vet. Res.* 63 (1999): 276-281.
- Góngora, A. *et al.* «Diagnóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la sabana de Bogotá. Énfasis en rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB)». *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia XLII 1* (1995): 37-42.
- Griffiths, I.; Gallego M. y Villamil, L. *Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia.* ICA, 1982.
- Gustad, F.; Lewis, T. y Berry, E. «The nucleotide sequence of the 5'-untranslated region of bovine viral diarrhoea virus: its use as a probe in rapid detection of bovine viral diarrhoea viruses and border disease viruses». *Molecular and Cellular Probes 7* (1993): 349-356.
- Hamel, A.; Wasykyshen, M. y Nayar P. «Rapid Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus by using RNA Extracted Directly from Assorted Specimens and One-Tube Reverse Transcription PCR Assay». *Journal of Clinical Microbiology* (1995): 287-291.
- Jaime, J.; Villamil, L.; Vera, V. y Ramírez, G. «Infección persistente con virus de diarrea viral bovina en hatos lecheros de la sabana de Bogotá». *Revista de medicina veterinaria y zootecnia. XLIV 1* (1996): 46-53.
- Jones, L.; Zandomeni, R. y Weber, E. «Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from Argentina». *Veterinary Microbiology 81* (2001): 367-375.
- Kelling, C. «Planning bovine viral diarrhea virus vaccinations programs». *Veterinary Medicine September* (1996): 873-877.
- Olafson, P.; Maccallum, A. y Fox F. «An apparently new transmissible disease of cattle». *International symposium bovine diarrhea virus a 50 years review* (1996): I-VI.
- Ramírez, M.; Arbeláez, G.; Vera, V.; Villamil, L. y Ramírez, G. «Utilización de inactivantes químicos en el suero bovino empleado como suplemento en cultivos celulares». *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia XLII 1* (1994): 48-51.
- Ridpath, J.; Bolin S. y Dubovi, E. «Segregation of bovine viral diarrhea into genotypes». *Virology 205* (1994): 66-74.
- - -. «Sequence diversity and genotyping». *International symposium bovine diarrhea virus a 50 years review* (1996): 39-42.
- - -. BVD Primer sequences. <<http://www.nadc.ars.usda.gov/research/vpdl/bvd/primer.htm>> [2000].
- Sakoda, Y. *et al.* «Heterogeneity of porcine and ruminant pestiviruses mainly isolated in Japan». *Veterinary Microbiology 65* (1999): 75-86.
- Tremblay, R. «Transmission of Bovine viral diarrhea virus». *Veterinary Medicine September* (1996): 858-866.
- Vilcek, S.; Alenius, S.; Paton, D.; Mittelholzer, C. y Belak, S. «Genetic clustering of bovine viral diarrhoea viruses in cattle farms: genetic identifications and analysis of viruses directly from cattle sera». *The Veterinary Journal 158* (1999): 33-38.
- Weinstock, D.; Bhudevi, B. y Castro, A. «Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled bovine serum». *Journal of Clinical Microbiology* (2001): 343-346.
- Wolf. <<http://www.research.umbc.edu/~jwolf/m12.htm>> [2002].