

Primera evidencia del Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB) genotipo 2 en Colombia

V. V. Villamil¹, G. C. Ramírez¹, V. J. Vera¹, J. A. Jaime^{1*}

Artículo recibido: 29 de octubre de 2015 · Aprobado: 6 de diciembre de 2017

RESUMEN

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un patógeno que afecta los hatos bovinos. El virus ha sido clasificado en dos biotipos (citopático y no citopático) y en 3 genotipos (1, 2 y 3) según su secuencia nucleotídica. El propósito de este estudio fue determinar la presencia del VDVB genotipo 2 (VDVB-2) en Colombia, mediante el estudio de cuatro zonas representativas de producción ganadera por medio de RT-PCR en muestras de suero y cartílago de oreja. Para ello, se recolectaron los sueros preparto de 379 vacas, de 274 terneros precalostrales (antes de que se les diera calostro), y de 145 terneros de 25 días post-nacimiento. Adicionalmente, se tomaron 181 biopsias de cartílago de oreja de estos terneros. Se realizó RT-PCR a todas las muestras para determinar la presencia o ausencia del VDVB. Aquellas muestras que resultaron positivas se evaluaron adicionalmente mediante dos métodos para determinar su genotipo: **a)** una nueva RT-PCR con primers específicos para el VDVB-2, y **b)** una PCR diferente con la que se obtuvo un producto de 296 pb, el cual se sometió a digestión enzimática. Los resultados mostraron que 17 (4,48%) muestras de suero preparto fueron positivas para *Pestivirus*, de las cuales 6 correspondieron al VDVB-2 (1,58%). Ninguna de las muestras de suero obtenidas de los terneros resultó positiva para el VDVB-2. Finalmente, 18 (9,9%) biopsias de cartílago de oreja fueron positivas al VDVB, 14 (7,7%) de las cuales resultaron positivas para el VDVB-2. El presente estudio es la primera evidencia documentada de la presencia del VDVB-2 en bovinos de Colombia.

Palabras Clave: Diarrea Viral Bovina, VDVB genotipo 2, RT-PCR, cartílago de oreja.

First evidence of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) genotype 2 in Colombia

ABSTRACT

The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is a pathogen that affects cattle. The virus has been classified into two biotypes (cytopathic and non-cytopathic) and three genotypes (1, 2 or 3) according to their nucleotide sequence. The objective of this study was to determine the presence of the BVDV genotype 2 (BVDV-2) in Colombia, through the study of four representative areas of cattle production by means of RT-PCR conducted on serum and ear notches. For this purpose, sera were collected from 379 prepartum

¹ Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Cr. 30 nro. 45-03, Bogotá (Colombia).

* Autor para correspondencia: jjaimec@unal.edu.co

cows, 274 calves born to these cows (before they were given colostrum), and 145 25-day-old calves. Additionally, 181 ear notches were taken from these calves. RT-PCR was performed on all samples to determine the presence or absence of BVDV. The samples that tested positive were further assessed by two methods to determine their genotype: **a)** a new RT-PCR with specific primers for BVDV-2, and **b)** a different PCR obtaining a product of 296 bp, which was further subjected to enzymatic digestion. The results showed that 17 (4.48%) parturition sera samples were positive for *Pestivirus*, from which 6 corresponded to BVDV-2 (1.58%). None of the sera obtained from the calves were positive for BVDV-2. Finally, 18 (9.9%) ear notches were positive for BVDV, 14 (7.7%) of which were positive for BVDV-2. The present study is the first documented evidence of the presence of the BVDV-2 in cattle from Colombia.

Keywords: Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV-2, RT-PCR, serum, ear notch.

INTRODUCCIÓN

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), perteneciente al género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae* (Wengler *et al.* 2001), es una infección que afecta a los hatos bovinos con diferentes manifestaciones clínicas que pueden ir desde formas asintomáticas (Fulton *et al.* 2005), hasta cuadros agudos de carácter entérico, reproductivo o respiratorio (Fulton *et al.* 2005; Ridpath *et al.* 2006). Los efectos generados por la enfermedad incluyen bajos índices de crecimiento en terneros (Xue *et al.* 2010), deficiencias reproductivas y susceptibilidad a la presentación de otras patologías.

Los *Pestivirus* han sido divididos en 5 especies de acuerdo con sus diferencias genómicas: el Virus de la Peste Porcina Clásica (cepa de referencia Alfort), Enfermedad de la Frontera (BD31), Diarrea Viral Bovina genotipo 1 (NADL), Diarrea Viral Bovina genotipo 2 (890) y un posible virus de Diarrea Viral Bovina genotipo 3 o "HoBi virus" que ha sido recientemente propuesto (Liu *et al.* 2009; Bauermann *et al.* 2013). Para clasificar el VDVB en alguno de los tres genotipos se emplea el análisis de la secuencia de la región no traducible 5'UTR del RNA viral, que corresponde a la porción más conservada

del genoma (Ridpath 1994; Tajima *et al.* 2001; Couvreur *et al.* 2002). Los genotipos 1 y 2 han sido a su vez clasificados en subgenotipos que han mostrado una homología entre el 80-85% (Fulton *et al.* 2005), los más representativos dentro de cada uno de los genotipos son el VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-2a y VDVB-2b (Ridpath *et al.* 1994; Flores *et al.* 2002). Adicionalmente, dentro de cada genotipo se pueden encontrar dos biotipos: no citopático (NCP) y citopático (CP) de acuerdo con la capacidad que estos tengan de inducir lisis en cultivos celulares (Peterhans y Schweizer 2010). El biotipo NCP es el más abundante en la naturaleza, a partir de este se generan las cepas CPs y también es el responsable de una de las manifestaciones más importantes de la enfermedad: la de animales persistentemente infectados (PI) (Brogden 2002).

Hasta la fecha, el estudio realizado en Colombia ha demostrado que el VDVB genotipo 1 (VDVB-1) es el de mayor distribución en el país y el que causa mayores problemas reproductivos (Vargas 2010). Estas cepas son conocidas como las clásicas y son empleadas en la elaboración de vacunas, en pruebas diagnósticas y en investigación (Fulton *et al.* 2005). Por su parte, los genotipos 2 y 3 tienen menos

incidencia a nivel mundial y aún no se ha determinado su presencia y efectos en el territorio nacional.

Además de las diferencias genómicas, los genotipos difieren en su comportamiento patogénico: el VDVB-1 se aisló de animales que presentaron cuadros de diarrea aguda y enfermedad de las mucosas; mientras que el VDVB-2 se aisló de animales que murieron infectados por la forma severa aguda de DVB, en terneros PI y en suero fetal bovino (SFB) contaminado (Ridpath *et al.* 1994). Análisis filogenéticos de este genotipo han logrado la identificación de dos especies: VDVB-2a y VDVB-2b (Flores *et al.* 2002; Mishra *et al.* 2008).

La forma más severa de la infección por VDVB es la asociada con los biotipos NCP, quienes causan una enfermedad clínica aguda, que cursa con trombocitopenia y un sangrado profuso en los bovinos, conocida como síndrome hemorrágico (Ridpath *et al.* 1994). Este síndrome se reportó inicialmente en Estados Unidos y Canadá (Pellerin *et al.* 1994); se caracteriza porque los animales presentan fiebre alta, leucopenia, trombocitopenia, diarrea, muerte en terneros adultos (Vargas 2010) y en algunos casos, enfermedad respiratoria severa, epistaxis, petequias, equimosis en mucosas y anemia. Adicionalmente, puede provocar deficiencias en las tasas de fertilización, vacas repetidoras, abortos, malformaciones congénitas y el establecimiento de animales PI que eliminan el VDVB durante largos periodos de tiempo (Bauermann *et al.* 2013). Por su parte, la infección aguda con el biotipo CP del VDVB-2 resulta en una enfermedad subclínica o con sintomatología reproductiva, respiratoria y digestiva (Vargas 2010). Como se mencionó anteriormente, las diferentes cepas del virus varían considerablemente en su virulencia, en general, la mayoría de casos de la forma

hemorrágica han sido atribuidos al VDVB-2 (Makoschey *et al.* 2001).

METODOLOGÍA

Fincas

Se muestrearon 15 fincas distribuidas en cuatro de las regiones ganaderas más representativas de Colombia ubicadas así: Mosquera, Cundinamarca (2), Medellín, Antioquia (3), Tierra de los Santos, Santander (1) y Cali, Valle del Cauca (9). Las fincas elegidas para el estudio se seleccionaron al azar de acuerdo con la disponibilidad de los propietarios para participar en la investigación.

Animales

El muestreo se realizó durante el periodo comprendido entre febrero a octubre de 2014. Los animales incluidos en el muestreo correspondieron a hembras con una gestación aproximada de 240-255 días de razas Holstein, Jersey, Pardo Suizo, Simmental, 7 colores y Ayrshire. En la Tabla 1 se detalla la cantidad de animales muestreados por grupo y por región.

Muestras

Se tomaron dos muestras de sangre de hembras bovinas preñadas: la primera, un mes antes del parto, denominada muestra preparto (PP) y la segunda, 20 días después del parto, denominada muestra posparto (POP). Adicionalmente, se tomaron dos muestras de sangre de cada uno de los terneros nacidos: la primera, luego de nacer antes de que el animal consumiera calostro, denominada muestra precalostro (PC) y la segunda, 25 días después del nacimiento (25 DD). Finalmente, se tomaron 2 biopsias de cartílago de oreja de cada uno de los terneros pertenecientes

al estudio, denominada muesca de oreja (MO) (Tabla 2).

Las muestras de sangre de las hembras (7-10 ml) se obtuvieron a partir de la vena coccígea y en los terneros (5-7 ml), a partir de la vena yugular; en los dos casos, las muestras se colectaron en tubos Vacutainer® sin anticoagulante. Una vez colectadas las muestras, se refrigeraron a 4°C y se procesaron dentro de las siguientes 18 horas en el Laboratorio de Virología Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Los tubos se centrifugaron entre 1300 a 2000 g durante 10 min y el suero se recolectó y almacenó a -70°C hasta su procesamiento. En la Tabla 2 se describe la distribución de las muestras de suero en hembras (PP y POP) y terneros (PC, 22 DD y MO).

Para obtener las MO de terneros, las orejas se lavaron con agua retirando restos de heces, tinta de tatuaje, leche, entre otros contaminantes que podrían afectar la biopsia (WVDL 2012); posteriormente, se tomó 1 cm del extremo de la oreja (Cornish *et al.* 2005) empleando la pinza ProSampler® (ProSampler's single-hole ear punching tool, Scandia, USA) y se depositó en un tubo eppendorf que contenía 200 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC por sus siglas en inglés). Las muestras se refrigeraron a 4°C y se trasladaron al laboratorio, donde se almacenaron a -70°C para su posterior análisis.

TABLA 1. Distribución y número de bovinos muestreados por región

Región	Hembras bovinas	Terneros	Total de animales
Cundinamarca	13	3	16
Santander	101	121	222
Antioquia	74	67	141
Valle del Cauca	191	164	355
Total	379	355	734

TABLA 2. Distribución de muestras de suero y cartílago auricular obtenidas

Región	Hembras			Terneros	
	PP	POP	PC	25 DD	MO
Cundinamarca	13	13	0	0	3
Santander	101	101	121	90	87
Antioquia	74	74	67	13	35
Valle del Cauca	191	191	86	42	56
Total	379	379	274	145	181

PP: Preparto, POP: Posparto, PC: Precalostral, 25DD: 25 días después de nacidos, MO: Muesca de oreja.

PCR para la detección de los genotipos virales

Las MO se sometieron a disrupción por maceración y se sonicaron a 16 kHz durante 30 seg; posteriormente, se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante a partir del cual se hizo extracción del ARN empleando el kit QIAamp® Viral RNA (Qiagen CA®). Como control positivo, se hizo extracción a partir de cultivos de células MDBK infectadas independientemente con las cepas VDVB-1 (NADL) y VDVB-2 (VS-260). Como control negativo, se realizó extracción de ARN de agua DEPC. El ARN obtenido se almacenó a -70°C hasta su procesamiento. La síntesis del ADNc a partir del RNA se hizo mediante RT-PCR; para esto, se mezcló el ARN (5 µl) con Random Primers (Invitrogen™) durante un ciclo de 65°C por 3 min. Posteriormente, se realizó la RT siguiendo el protocolo de Zhang *et al.* (2012) mediante el empleo de la transcriptasa reversa M-MVL (Invitrogen®), durante un ciclo de síntesis de ADNc de 60 min a 56°C, seguido de una fase de pre-denaturación a 94°C durante 5 min. La RT-PCR se realizó en el termociclador Biorad® DNA Engine. El ADNc se alma-

cenó a -20°C para posteriores análisis. A través de PCR se amplificó inicialmente un segmento de 288pb de la región 5'UTR del genoma de VDVB común para los *Pestivirus* empleando los primers: **F324**: 5'ATGCC-CWTAGTAGGACTAGCA 3' y **R326**: 5'TCAACTCCATGTGCCATGTAC 3' (Vilček *et al.* 1994). Como control se utilizó la cepa de referencia NADL. Se tomaron 5 μl de ADNc junto con 20 μl de mezcla maestra para PCR (1,5 μl de Cloruro de Magnesio; 12,3 μl de Agua; 1,5 μl de dNTPs; 2,5 μl de Buffer 10x; 0,2 μl de Taq polimerasa (InvitrogenTM); 1 μl primer forward y 1 μl de primer reverse). Las condiciones de la PCR fueron: denaturación a 94°C durante 30 seg, anillamiento a 53°C por 30 seg y extensión a 72°C durante 30 seg, en 35 ciclos.

Posteriormente, el ADNc de aquellas muestras que resultaron positivas a la amplificación de *Pestivirus* se sometieron a otra PCR para determinar si correspondían al VDVB-2; para ello, se emplearon primers específicos (Letellier 1999) que amplifican un segmento de 221pb sobre la región 5'UTR (**5'UTR F**: 5' ACTAGCGGTAGCAGTGAG 3' y **5'UTR R**: 5' CTAGCGGAATAGCAGGTC 3'). Se adicionaron 5 μl de ADNc a cada tubo con 20 μl de mezcla para PCR (1,5 μl de Cloruro de Magnesio; 12,3 μl de Agua; 1,5 μl de dNTPs; 2,5 μl de Buffer 10x PCR; 0,2 μl de Taq polimerasa (Platinum Taq DNA Polymerase, InvitrogenTM); 1 μl de primer forward y 1 μl de primer reverse). Las condiciones de PCR fueron: denaturación a 94°C durante 1 min, anillamiento a 51°C por 1 min y extensión a 72°C durante 1 min, en 35 ciclos.

Digestión enzimática para la diferenciación de genotipos 1 y 2

Con el fin de confirmar aquellas muestras que resultaron positivas por PCR para el genotipo 2, se hizo digestión con la enzima

BstNI. Para esto, se realizó una nueva PCR empleando otros primers sobre la región 5'UTR (**F-OPES13A**: 5'GCTAGCGATGCCCTTAGTAGGA3', **R-OPES14A**: 5'ATCAACTCCATGTGCCATTTACAGC 3') reportados por Ståhl *et al.* (2005) generando un amplificado de 296 pb. La PCR se realizó en un termociclador Biorad[®] DNA Engine bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94°C , seguido por 35 ciclos de 30 seg a 94°C , 30 seg a 50°C , 30 seg a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C . Posteriormente, los amplicones fueron digeridos tomando 5 μl del producto de la PCR, 3,5 μl de agua DEPC, 1 μl de buffer de la enzima (10X NEB Buffer) y 0,5 μl de *BstNI* (New England BioLabs Inc. [®]). Se incubó a 60°C durante 1 hora. Las digestiones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (Sigma[®]) al 1,5%, a un voltaje constante de 90V durante una hora. Los geles se visualizaron mediante revelado por inmersión con el agente intercalante GelRed (Thermo Scientific [®]) y se evaluaron en fotodocumentador (Gel Doc 1000, Biorad[®], CA). Como controles positivos para la digestión enzimática se emplearon las cepas de referencia para el VDVB-1: NADL y para el VDVB-2: VS-260. Como control negativo se hizo extracción de ARN de agua DEPC. Para realizar la extracción, se empleó el kit QIAamp[®] Viral RNA (Qiagen CA[®]) según el procedimiento Qiagen One Step RT-PCR (2002).

RESULTADOS

Mediante RT-PCR se amplificaron las diferentes muestras (PP, POP, PC, 25DD y MO) para evidenciar la presencia de un amplicón de 288 pb, correspondiente a *Pestivirus* (Figura 1A). Posteriormente, se amplificó otro segmento de la región

5'UTR con primers específicos para el VDVB-2, obteniendo como resultados positivos aquellos que amplificaron un segmento de 221 pb (Figura 1B).

En las fincas de la región de Cundinamarca, de 13 muestras de suero PP de hembras, una (7,69%) resultó positiva

a *Pestivirus* y correspondió al VDVB-2. Entre las 4 muescas de oreja de los terneros no se detectaron positivos a *Pestivirus*.

Por su parte, en la finca de la región de Santander, se encontró que de 101 muestras de suero PP de las hembras, 8 (7,92%) amplificaron para el VDVB, de las cuales,

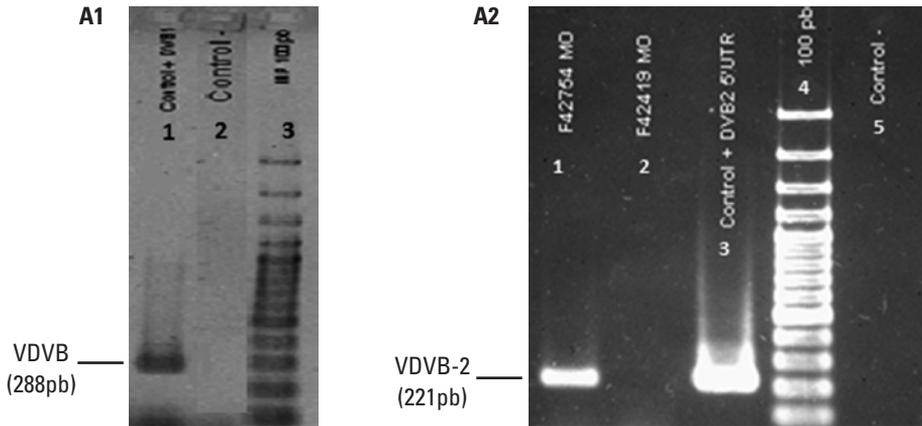


FIGURA 1. Amplificación por RT-PCR para detección del VDVB-2. **1A.** (1) Control positivo VDVB Cepa NADL; (2) Control negativo; (3) Marcador de peso molecular (pb). **1B.** (1) Muestra positiva de muesca de oreja al VDVB-2; (2) Muestra negativa de muesca de oreja al VDVB-2; (3) Control positivo VDVB-2 Cepa VS-260; (4) Marcador de peso molecular (pb); (5) Control negativo.

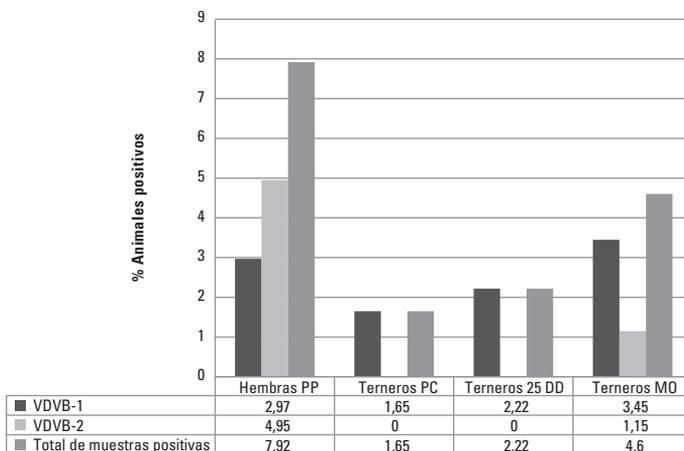


FIGURA 2. Porcentaje de bovinos positivos por RT-PCR al VDVB y VDVB-2 en fincas de la región de Santander. **PP:** Preparto, **PC:** Precalostal, **25DD:** 25 días después de nacidos, **MO:** Muesca de oreja.

5 (4,95%) correspondieron al VDVB-2 y 3 (2,97%) al VDVB-1. Por otro lado, de las 121 muestras de suero PC obtenidas de los terneros, 2 (1,65%) fueron positivas al VDVB-1; a su vez, de los 90 sueros colectados 25 días después del nacimiento en los terneros (25 DD), se encontró que 2 (2,22%) resultaron positivos al VDVB-1, correspondiendo a los mismos que fueron positivos en la muestra PC. Finalmente, de las 87 muescas de oreja obtenidas, se encontraron 3 biopsias (3,45%) positivas al VDVB-1 y 1 muestra (1,15%) positiva al VDVB-2 (Figura 2).

En cuanto a las fincas de la región del Valle del Cauca se encontró que de 191 sueros PP de hembras, 5 (2,6%) fueron positivos al VDVB-1. En los terneros, de 86 muestras de suero PC, 3 (3,2%) fueron positivas al VDVB-1. En el caso de los sueros 25 DD ninguna de las 42 muestras resultó positiva al VDVB. Por su parte, las muescas de oreja obtenidas de los terneros, demostraron que de 56 biopsias de cartílago auricular, 13 (23,2%)

amplificaron para el VDVB y todas correspondían al VDVB-2 (Figura 3).

La distribución de los genotipos virales en sueros PP de hembras por zona evaluada, mostró la presencia de ambos genotipos en la finca del departamento de Santander, mientras que en los predios de las regiones Antioquia y Valle del Cauca se encontró únicamente el VDVB-1, en contraste con las fincas evaluadas de la región de Cundinamarca en donde se evidenció solamente el VDVB-2 (Figura 4). Para los terneros, al comparar por zonas de muestreo, se determinó que el VDVB-2 solo se encontró en muestras de MO y estuvo presente únicamente en los departamentos de Santander y del Valle del Cauca con 0,5% y 7,1%, respectivamente (Figura 5).

Finalmente, todas las muestras que resultaron positivas por RT-PCR al VDVB-2 se confirmaron mediante digestión de la enzima *BstNI*, lo que evidenció que la enzima cliva únicamente el genoma del VDVB-1, dividiendo el fragmento en

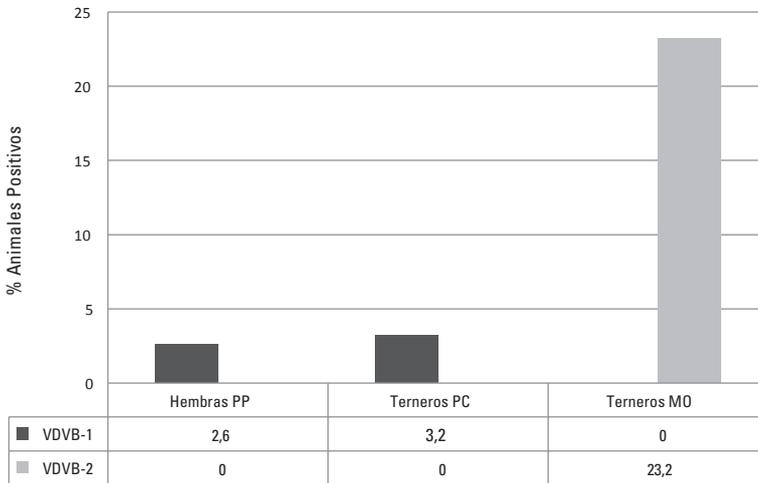


FIGURA 3. Porcentaje de bovinos positivos por RT-PCR para el VDVB-1 y VDVB-2 en fincas del Valle del Cauca. **PP:** Preparto, **PC:** Precalostral, **MO:** Muesca de oreja.

186 y 110 pb (Figura 6). Según el patrón observado se confirmaron como VDVB-2 13 muestras MO de terneros del Valle del Cauca, 5 muestras de suero sanguíneo PP de hembras de Santander, 1 MO de un ternero de Santander y 1 muestra de suero sanguíneo PP de una hembra procedente de Cundinamarca (Figura 7).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó la presencia del VDVB en todas las regiones evaluadas, mientras que el VDVB-2 se encontró por primera vez en el país en fincas ubicadas en las regiones de Cundinamarca, Santander y Valle del Cauca. El VDVB-2 se describió inicialmente en Estados Unidos

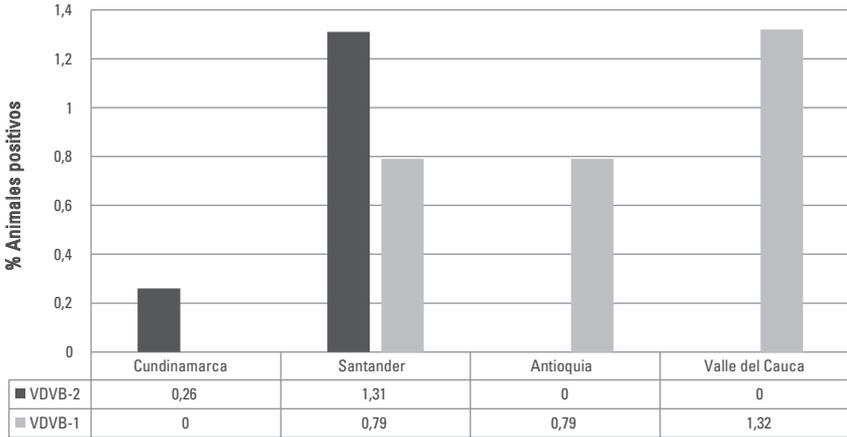


FIGURA 4. Distribución de genotipos virales 1 y 2 del VDVB en sueros preparto (PP) de hembras bovinas en las cuatro regiones evaluadas.

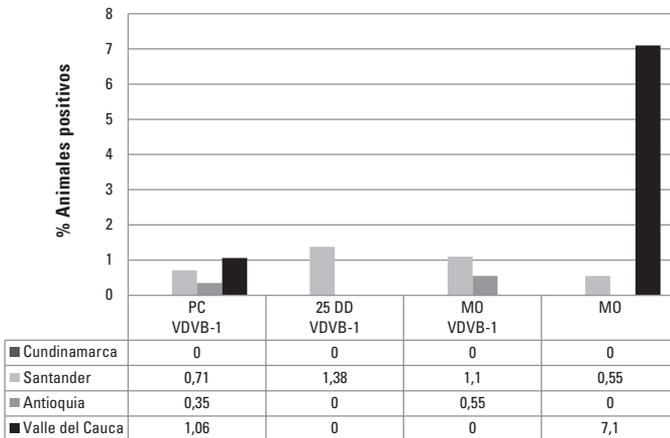


FIGURA 5. Distribución de los genotipos virales 1 y 2 del VDVB en sueros PC, 25 DD y MO en terneros en fincas de las cuatro regiones evaluadas. **PC:** Precalostral, **25DD:** 25 días después de nacidos, **MO:** Muesca de oreja.

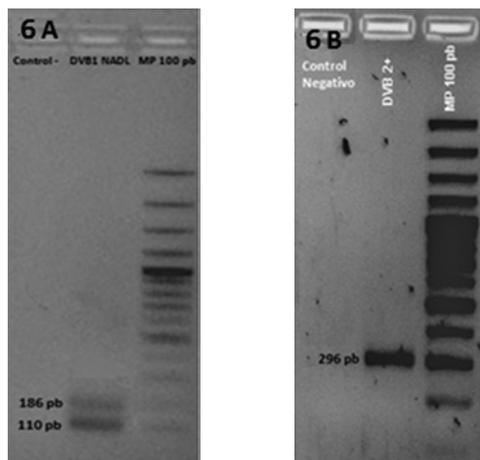


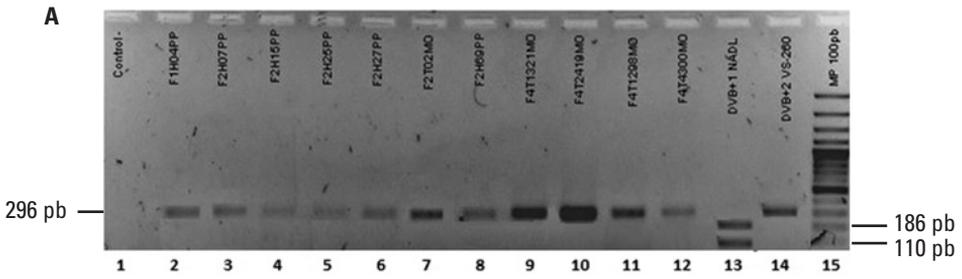
FIGURA 6. Digestión enzimática en controles positivos para VDVB-1 y VDVB-2. Digestión realizada empleando la enzima BstNI: 6A. Clivaje del producto del control de la cepa de referencia NADL para el VDVB-1 correspondiente a 186 pb y 110 pb. 6B. Producto del control obtenido de la cepa de referencia VS-260 correspondiente a 296 pb.

en un caso fatal de la Enfermedad de las mucosas a finales de los años 80's (Corapi *et al.* 1989; Carman *et al.* 1998), en Canadá (USDA 1995), en Europa hace varios años (Wolfmeyer *et al.* 1997; Van Rijin *et al.* 1997; Vilček *et al.* 2001; Falcone *et al.* 2001) y en Japón (Nagai *et al.* 1998). En Suramérica, el VDVB-2 se detectó por primera vez en Brasil, en donde los análisis filogenéticos sugieren que éstas cepas difieren genéticamente del VDVB-2 aislado en Norteamérica (Flores *et al.* 2002) y en Argentina (Odeón *et al.* 2003). Recientemente, se detectó en África, específicamente Suráfrica, donde se demostró una similitud en la secuencia con la cepa de referencia 890 proveniente de Norteamérica, (Ularamu *et al.* 2013).

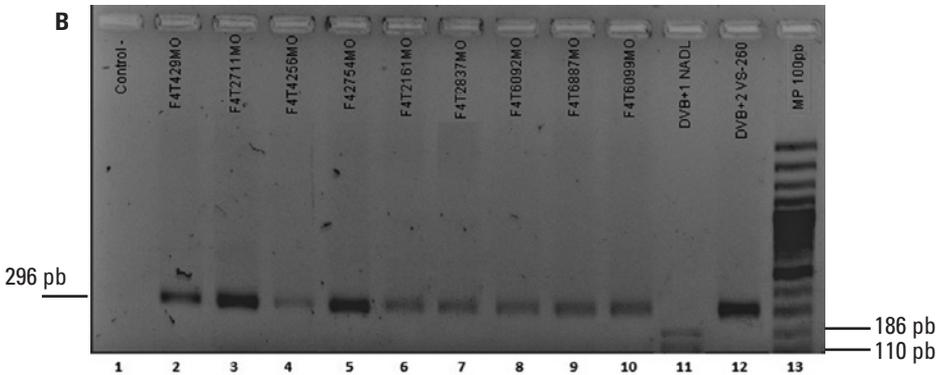
Los resultados del presente trabajo además de demostrar la presencia del genotipo 2 del VDVB en Colombia, aportan una metodología diagnóstica para la detección del mismo a través de PCR sobre la región 5'UTR del genoma viral (Couvreur *et al.* 2002; Yilmaza *et al.* 2012). Esta región

constituye la zona del genoma viral más empleada para su caracterización (Wolfmeyer *et al.* 1997; Flores *et al.* 2002) ya que es altamente conservada (Cortez *et al.* 2006) y permite una óptima amplificación (Ridpath 1994; Ridpath y Bolin 1995). Es importante mencionar que en 3 de las 4 regiones muestreadas en este estudio se evidenció la presencia del VDVB-2, lo que constituye un aporte importante para valorar la enfermedad dentro del país. En países en donde se han realizado estudios similares, se han evaluado regiones geográficas específicas como en el caso de Túnez (Thabti *et al.* 2005), Brasil (Weber *et al.* 2014), Inglaterra (Wakeley *et al.* 2004) y Alemania (Tajima *et al.* 2001), por lo que es pertinente resaltar, que en concordancia, en la presente investigación se evaluó la presentación de los genotipos de forma simultánea en varias regiones geográficas de Colombia.

Aunque la cantidad de muestras de suero obtenidas de hembras en las fincas de la región de Cundinamarca fue pequeña



7A. 1) Control negativo, 2) Suero F1H04PP Cundinamarca, 3) Suero F2H07PP Santander, 4) Suero F2H15PP Santander, 5) Suero F2H25PP Santander, 6) Suero F2H27PP Santander, 7) Biopsia F2T02MO Santander, 8) Suero F2H69PP Santander, 9) Biopsia F4T1321MO Valle, 10) Biopsia F4T2419MO Valle, 11) Biopsia F4T1298MO Valle, 12) Biopsia F4T4300MO Valle, 13) Control DVB1 Cepa NADL, 14) Control DVB2 Cepa VS-260, 15) 100 MP 100 pb).



7B. 1) Control Negativo, 2) Biopsia F4T429MO Valle, 3) Biopsia F4T2711MO Valle, 4) Biopsia F4T4256MO Valle, 5) Biopsia F4T2754MO Valle, 6) Biopsia F4T2161MO Valle, 7) Biopsia F4T2837MO Valle, 8) Biopsia F4T6092MO Valle, 9) Biopsia F4T6887 Valle, 10) Biopsia F4T6099 Valle, 11) Control DVB1 Cepa NADL, 12) Control DVB2 Cepa VS-260, 13) MP 100 pb).

FIGURA 7. Digestión enzimática empleando la enzima *Bst*NI en muestras de cartilago auricular (MO) provenientes de fincas de Cundinamarca, Santander y Valle del Cauca.

(13) se logró detectar la presencia del VDVB-2, lo que conduce a la hipótesis de que existe una alta probabilidad de que este genotipo se encuentre en otros bovinos de la zona. En la región de Santander se encontró el mayor porcentaje de hembras positivas al VDVB-2 (4,48%), superior comparativamente con los predios de las

otras regiones estudiadas, lo que podría indicar una alta circulación del genotipo en la zona. El origen y la fecha de introducción del VDVB-2 en Colombia son inciertos y no se puede establecer mediante el presente estudio, para ello se hace necesaria una investigación retrospectiva. A falta de estos datos varias hipótesis

pueden ser propuestas: es probable que la introducción del VDVB-2 sea reciente y se haya producido a través de la importación de ganado o semen (Givens *et al.* 2003) de países en donde se ha demostrado la presencia de este genotipo, como en Brasil y Argentina. Se podría sospechar también que su introducción pudo deberse al uso de vacunas contaminadas con *Pestivirus*, como ha sido reportado en la literatura (Falcone *et al.* 2001). Adicionalmente, puede deberse a la implementación de diferentes técnicas biotecnologías reproductivas en los hatos sin que se realice seguimiento sanitario periódico. Es posible que semen contaminado de toros infectados o toros PI puedan transportar el virus como también es posible que el semen de toros que presenten infecciones testiculares persistentes puedan infectar a las hembras (Martínez y Riviera 2008). Finalmente, gametos y otras células derivadas de algún animal enfermo representan una fuente importante de contaminación cuando estos son empleados en la producción y transferencia de embriones (Martínez y Riviera 2008).

En cuanto a la presencia de animales PI en el estudio, se podría sugerir que aquellos terneros que resultaron positivos al virus por RT-PCR en la muestra de suero PC y en la muestra obtenida a los 25 DD (Finca de la región de Santander) podrían ser eventualmente animales PI, debido a que bovinos con este tipo de infección nacen con viremia persistente, siendo ambas muestras positivas en el tiempo a la detección de genoma viral y negativas a anticuerpos (OIE 2008). Adicionalmente, en el presente estudio se evaluaron muestras de suero y cartílago auricular mediante la técnica de RT-PCR (Amer y Almajhdi 2011), como ya se ha reportado en otros estudios (Hertig *et al.* 1991).

Las muestras de cartílago de oreja se han convertido en el tejido de elección para detección de genoma viral ya que son fáciles de coleccionar, el equipo necesario es mínimo, no existe alteración de la muestra a causa de anticuerpos pasivos y se pueden emplear en diferentes técnicas diagnósticas como IHC, qRT-PCR, RT-PCR y AgELISA (Ridpath *et al.* 2006).

En el presente estudio se obtuvo un porcentaje de detección del 9,39% lo que coincide con lo reportado en otras investigaciones como en la realizada por Fulton *et al.* (2006), donde se evaluaron MO de 21.743 terneros mediante diferentes técnicas y se encontró una prevalencia de animales PI del 0.4%. La tasa de detección para VDVB encontrada en el presente estudio se puede atribuir al hecho de que únicamente se tomaron biopsias de los terneros y no de las hembras incluidas en el muestreo. Sin embargo, lo relevante es que se logró realizar la detección del VDVB-2, particularmente en terneros del Valle del Cauca, lo que permite dar resultados acerca de la dinámica de los genotipos virales en el país. Igualmente, se encontraron únicamente 8 sueros positivos al virus en los terneros evaluados, frente a 20 biopsias de cartílago auricular positivas y llamativamente 13 de esas muestras correspondían al VDVB-2. Este resultado lleva a varias reflexiones: por un lado que la probabilidad de encontrar virus en suero no es muy alta, esto se explica porque la muestra debe coincidir con la presencia de un animal en estado de viremia o de persistencia viral; por otra parte, la MO de acuerdo con nuestros resultados constituye una muestra muy eficiente en detección de genoma viral en animales aparentemente sanos y particularmente para determinar la presencia de genotipos. En efecto, según Ridpath *et al.* (2006) las biopsias de oreja

cuentan con la ventaja de ser relativamente más estables que la sangre debido a que pueden mantenerse almacenadas a temperatura ambiente (25°C) hasta por 7 días, lo que permitiría realizar muestreos en lugares que no cuenten con sistemas de refrigeración y además podrían procesarse posteriormente sin perder la precisión para el diagnóstico del VDVB.

Las muestras positivas al VDVB-2 por RT-PCR se confirmaron mediante digestión enzimática con *BstNI* como ha sido reportado en varios estudios (Vilček 1994) para diferenciar entre *Pestivirus* como VDVB, CSFV y BDV y entre genotipos del VDVB. En el presente estudio, se confirmaron las muestras positivas al genotipo 2 del VDVB, lo que coincide con la literatura reportada por Pizarro-Lucero *et al.* (2006), en donde se aislaron 33 *Pestivirus* de animales de diferentes granjas de Chile amplificando la región 5'UTR del genoma viral con una posterior digestión, empleando las enzimas de restricción *Bgl I*, *XhoI* y *PstI*; 16 de los aislamientos se clasificaron como VDVB-1 y 17 como VDVB-2.

En Colombia cualquier investigación realizada en casos individuales y poblacionales del VDVB debe mantenerse encaminada a controlar el virus dentro de los hatos, identificando los animales infectados que podrían constituir una amenaza epidemiológica, precisando la detección y genotipificación del VDVB. Es importante resaltar que aquellas muestras que resultaron positivas a *Pestivirus* podrían corresponder eventualmente al VDVB-3, por lo que se sugiere un estudio que determine la posible presencia de los HoBi-like virus en el país.

Es importante realizar estudios que correlacionen variables tales como el número de parto, alimentación, manejo, condiciones climáticas y región del país con

la presentación del VDVB-2. Así mismo, hacer un seguimiento de la sintomatología clínica de las hembras y terneros dentro de las explotaciones como método para detectar los animales PI. Igualmente, se recomienda realizar un estudio en el cual se implementen técnicas inmunohistoquímicas para el diagnóstico de bovinos PI en las muescas de cartílago de oreja almacenadas debido al reconocido epiteliotropismo del VDVB. (Thür *et al.* 1996; Njaa *et al.* 2000).

Este estudio ratifica la presencia del VDVB en las zonas de mayor producción ganadera del país, adicionalmente, representa la primera evidencia documentada del genotipo 2 del VDVB en bovinos de Colombia lo que constituye un nuevo elemento para tener en cuenta en los programas de control de la enfermedad en el país, llevando al mejor conocimiento de las cepas que se encuentran dentro y entre hatos e igualmente, contribuye a verificar si los planes de vacunación empleados contra el VDVB en Colombia cubren inmunológicamente a los animales expuestos contra los virus circulantes.

CONCLUSIONES

El presente estudio representa la primera evidencia documentada del genotipo 2 del VDVB en Colombia; el origen y la fecha de introducción de este genotipo en el país son inciertos y no se puede establecer mediante el presente estudio. En 3 de 4 de las regiones geográficas estudiadas se evidenció la presencia del VDVB-2 y fue posible detectar los genotipos 1 y 2 de forma simultánea. En el país son pocos los estudios enfocados a la detección del VDVB mediante técnicas moleculares, el presente es el primero que combina análisis de detección molecular junto con

la diferenciación de genotipos en muestras de suero y cartílago de oreja. Aunque la cantidad de muestras de suero de hembras obtenidas de la región de Cundinamarca fue pequeña (13 muestras), éstas permitieron determinar la presencia del VDVB-2, lo que lleva a pensar que existe una considerable probabilidad de que el genotipo 2 esté en otros bovinos de la zona.

Los resultados positivos al VDVB-2 se confirmaron mediante digestión enzimática dado que las endonucleasas de restricción son ampliamente empleadas para diferenciar los genogrupos pertenecientes al género de los Pestivirus 1. En el presente estudio se empleó la enzima *BstNI* con la que se confirmaron las muestras positivas al genotipo 2 del VDVB, lo que coincide con la literatura reportada por Pizarro-Lucero *et al.* (2006). A partir de ésta investigación, se confirmó que es posible realizar la genotipificación del virus mediante digestión enzimática, al clasificar 16 aislamientos como VDVB-1 y 17 aislamientos como VDVB-2. La secuenciación realizada mostró una alta similitud con la cepa de referencia VS-123.4 que correspondía a un aislamiento del VDVB-2 de Brasil, lo que podría ser atribuido a la cercanía geográfica con ese país o por la introducción de ganado y/o semen contaminado.

La muestra de elección para detectar el genotipo 2, tanto por su manejo como por la probabilidad de encontrar el virus, es la muesca de oreja que puede ser evaluada mediante RT-PCR o por AgELISA, con niveles de confiabilidad del 95% al ser comparada con otras muestras como suero sanguíneo, saliva e hisopados nasales.

RECOMENDACIONES

Aquellas muestras que resultaron positivas al VDVB-1 podrían corresponder eventualmente al VDVB-3, por lo que

se sugiere un estudio que determine la posible presencia de los HoBi-like virus en el país. Adicionalmente, se deben realizar estudios posteriores que correlacionen variables tales como el número de parto, alimentación, manejo, condiciones climáticas y región del país con la presentación del VDVB-2. De igual forma, se recomienda realizar un seguimiento de la sintomatología clínica de las hembras y terneros dentro de las explotaciones, como método para detectar los animales PI e implementar técnicas IHC para el diagnóstico de bovinos PI.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Humberto Guáqueta M, por su colaboración en la obtención y recuperación de las muestras. Esta investigación fue patrocinada por Colciencias (1101-521-28351) y por la DIEB (20712) de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

REFERENCIAS

- Amer HM, Almajhdi FN. 2011. Development of a SYBR green I based real-time RT-PCR assay for detection and quantification of bovine coronavirus. *J. Mol Cell Probes.* 25: 101–107. Doi: 10.1016/j.mcp.2011.03.001.
- Bauermann FV, Ridpath JF, Weiblen R, Flores EF. 2013. Hobi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J Vet Diagn Invest.* 25: 6–15. Doi: 10.1177/1040638712473103.
- Brogden KA, Guttmiller JM, editores. 2002. *Polymicrobial diseases* [Internet]. Washington DC, USA. ASM Press; [citado 2015 ago. 6]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2475/>.
- Carman SN, van Dreumel TA, Ridpath JF, Hazlett MJ, Alves DM, Dubovi EJ, Tremblay RR, Bolin SR, Godkin AJ, Anderson NG. 1998. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993–1995. *J Vet Diagn Invest.* 10(1): 27–35. Doi: 10.1177/104063879801000106.

- Corapi WV, French TW, Dubovi EJ. 1989. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytotoxic bovine viral diarrhoea virus. *J Virol.* 63(9): 3934–3943.
- Cornish TE, Van Olphen AL, Cavender JL, Edwards JM, Jaeger PT, Vieyra LF, Woodard DR, Miller DO. 2005. Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest.* 17(2): 110–117. Doi: 10.1177/104063870501700203.
- Cortez A, Heinemann MB, De Castro MG, Soares RM, Pinto AM, Alfieri AA, Flore SEF, Cerqueira LR, Richtzenhain LJ. 2006. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'UTR region. *Pesq Vet Bras.* 26: 211–216. Doi: 10.1590/S0100-736X2006000400005.
- Couvreur B, Letellier C, Collard A, Quenon P, Dehan P, Hamers C, Pastoret PP, Kerkhofs P. 2002. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res.* 85: 17–28. Doi: 10.1016/S0168-1702(02)00014-X.
- Falcone E, Cordioli P, Sala G, Tarantino M, Tollis M. 2001. Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle in northern Italy. *J Vet Res Commun.* 25: 161-167. Doi: 10.1023/A:1006465120869.
- Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel FS, Gil LH. 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *J Virus Res.* 87: 51–60. Doi: 10.1016/S0168-1702(02)00080-1.
- Fulton RW, Hessman BE, Johnson BJ, Ridpath JF, Saliki JT, Burge LJ, Sjeklocha DB, Confer AW, Funk RA, Payton ME. 2006. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. *J Am Vet Med Assoc.* 228(4): 578-584. Doi: 10.2460/javma.228.4.578.
- Fulton RW, Ridpath JF, Ore S, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME. 2005. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet Microbiol.* 111: 35-40. Doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.002.
- Givens M, Heath A, Brock K, Brodersen B, Carson R, Stringfellow D. 2003. Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpuberal bulls. *Am J Vet Res.* 64(4): 428-434.
- Hertig C, Pauli U, Zanoni R, Peterhans E. 1991. Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *J Vet Microbiol.* 26(1-2): 65-76. Doi: 10.1016/0378-1135(91)90042-E.
- Letellier C, Kerkhofs P, Wellmians G, Vanopdenbosch E. 1999. Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet Microbiol.* 64: 155-167. Doi: 10.1016/S0378-1135(98)00267-3.
- Liu L, Xia H, Wahlberg N, Belák S, Baule C. 2009. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology.* 385(2): 351-357. Doi: 10.1016/j.virol.2008.12.004.
- Makoschey B, Janssen MG, Vrijenhoek MP, Korsten JHM, Marel P. 2001. An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *J Vaccine.* 19: 3261-3268. Doi: 10.1016/S0264-410X(01)00003-2.
- Martínez P, Riveira I. 2008. Antecedentes, generalidades y actualización en aspectos de patogenesis, diagnóstico y control de la diarrea viral bovina (DVB) y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) [tesis de pregrado]. [Bogotá (CO)]. Universidad Javeriana.
- Mishra N, Rajukumar K, Vilceck S, Tiwari A, Satav JS, Dubey SC. 2008. Molecular characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolate originating from a native Indian sheep (*Ovis aries*). *Vet Microbiol.* 130: 88–98. Doi: 10.1016/j.vetmic.2008.01.005.
- Nagai M, Sato M, Nagano H, Pang H, Kong X, Murakami T, Ozawa T, Akashi H. 1998. Nucleotide sequence homology to bovine viral diarrhoea virus 2 (BVDV2) in the 5' untranslated region of BVDVs from cattle with mucosal disease or persistent infection in Japan. *Vet Microbiol.* 60: 271-276. Doi: 10.1016/S0378-1135(98)00158-8.

- Njaa BL, Clark EG, Janzen E, Ellis JA, Haines DM. 2000. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J Vet Diagn Invest.* 12(5): 393-399. Doi: 10.1177/104063870001200501.
- Odeón AC, Risatti G, Kaiser GG, Leunda MR, Odriozola E, Campero CM, Donis RO. 2003. Bovine viral diarrhoea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Vet Microbiol.* 96: 133-144. Doi: 10.1016/S0378-1135(03)00210-4.
- [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008. Manual de pruebas de Diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas) [Internet]. Paris (FR): OIE; [citado 2014 nov. 14]. Disponible en: <https://www.oie.int/doc/ged/D6508.PDF>.
- Pellerin C, van den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortality. *Virology.* 203: 260-268.
- Peterhans E, Schweizer M. 2010. Pestiviruses: how to outmaneuver your hosts. *Vet Microbiology* 142: 18-25. Doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.038.
- Pizarro-Lucero J, Celedón M, Aguilera M, de Calisto M. 2006. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet Microbiol.* 115(1-3): 208-217. Doi: 10.1016/j.vetmic.2006.02.009.
- Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology.* 205: 66-74. Doi: 10.1006/viro.1994.1620.
- Ridpath JF, Bolin SR. 1995. The Genomic Sequence of a Virulent Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) from the Type 2 Genotype: Detection of a Large Genomic Insertion in a Noncytopathic BVDV. *J Virol.* 212(1): 39-46. Doi: 10.1006/viro.1995.1451.
- Ridpath JF, Hessman BE, Neill JD, Fulton R, Step D. 2006. Parameters of ear notch samples for BVDV testing: stability, size requirements and viral load. *Proc Am Assoc Bov Pract Conf.* 39: 269-270.
- Ståhl K, Kampa J, Baule C, Isaksson M, Moreno J, Belak S, Alenius S, Lindberg A. 2005. Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. *Pre Vet Med.* 72(1-2): 103-108. Doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.01.021.
- Tajima M, Frey H.R, Yamato O, Maede Y, Moennig V, Scholz H, Greiser-Wilke I. 2001. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res.* 76: 31-42. Doi: 10.1016/S0168-1702(01)00244-1.
- Thabti F, Bakkali Kassimi L, M'zah A, Ben Romdane S, Russo P, Ben Said MS, Hammami S, Pepin M. 2005. First detection and genetic characterization of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) types 1 and 2 in Tunisia. *Revue Méd Vét.* 156(8): 419-422.
- Thür B, Zlinszky K, Ehrensberger F. 1996. Immunohistochemical Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Skin Biopsies: a Reliable and Fast Diagnostic Tool. *J Vet Med B.* 43: 163-166. Doi: 10.1111/j.1439-0450.1996.tb00301.x.
- Ullaramu HG, Sibeko KP, Bosman AB, Venter EH, van Vuuren M. 2013. Genetic characterization of bovine viral diarrhoea (BVD) viruses: confirmation of the presence of BVD genotype 2 in Africa. *Arch Virol.* 58(1): 155-163. Doi: 10.1007/s00705-012-1478-5.
- [USDA] United States Department of Agriculture. 1995. Update on bovine viral diarrhoea virus disease. Fort Collins, CO. USDA / NAHMS; [citado 2015 jun. 10]. Disponible en: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy_monitoring/bvd_update95.pdf.
- Van Rijn PA, van Gennip HG, Leendertse CH, Brusckhe CJ, Paton DJ, Moormann RJ, van Oirschot JT. 1997. Subdivision of the pestivirusgenus based on the envelope glycoprotein E2. *Virology.* 237: 337-348. Doi: 10.1006/viro.1997.8792.
- Vargas DS. 2010. Construcción de un adenovector que exprese proteínas inmunogenicas del virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) [tesis]. [Bogotá (CO)]: Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.
- Vilcek S, Paton DJ, Duekovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least

- 11 genetic groups. Arch Virol. 146: 99-115. Doi: 10.1007/s007050170194.
- Vilcek S, Herring A, Nettleton P, Lowings J, Paton J. 1994. Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polimerasa chain reaction and restriction endonuclease analyses. Arch Virol. 136: 309-323. Doi: 10.1007/BF01321060.
- Wakeley P, Turner J, Ibata G, King D, Sandvik T, Howard P, Drew T. 2004. Characterisation of a type 2 bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle in the UK. Vet Microbiol. 102: 19-24. Doi: 10.1016/j.vetmic.2004.05.005.
- Weber MN, Silveira S, Machado G, Groff F, Mósen A, Budaszewski R, Dupont P, Corbellini L, Canal CW. 2014. High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. Virus Res. 191: 117-124. Doi: 10.1016/j.virusres.2014.07.035.
- Wengler G, Bradley M, Collet F, Heinz R, Schlesinger W, Strauss J. 2001. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type 1. J Clin Microbiol. 39: 146-153. Doi: 10.1128/JCM.39.1.146-153.2001.
- Wolfmeyer A, Wolf G, Beer M, Strube W, Hehnen H-R, Schmeer N, Kaaden OR. 1997. Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. Arch Virol. 142: 2049-2057. Doi: 10.1007/s007050050222.
- Xue F, Zhu YM, Li J, Zhu LC, Ren XG, Feng JK, Shi HF, Gao YR. 2010. Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China between 2005 and 2008. Vet Microbiol. 143: 379-383. Doi: 10.1016/j.vetmic.2009.11.010.
- Yilmaza H, Altana E, Ridpath JF, Turana N. 2012. Genetic diversity and frequency of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detected in cattle in Turkey. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 35: 411-416. Doi: 10.1016/j.cimid.2012.03.006.
- Zhang XJ, Han QY, Sun Y, Qiu HJ. 2012. Development of a triplex TaqMan real-time RT-PCR assay for differential detection of wild-type and HCLV vaccine strains of classical swine fever virus and bovine viral diarrhoea virus 1. Res Vet Sci. 92(3): 512-518. Doi: 10.1016/j.rvsc.2011.03.029.
- [WVDL] Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory. 2012. General Submission Information [Internet]. Wisconsin (MD): University of Wisconsin; [citado 2014 dic. 12]. [Disponible en: <http://www.wvdl.wisc.edu/index.php/submission-guidelines/>].

Article citation

Villamil VV, Ramírez GC, Vera VJ, Jaime JA. Primera evidencia del Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB) genotipo 2 en Colombia. [First evidence of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) genotype 2 in Colombia]. Rev Med Vet Zoot. 64(1): 11-26. Doi: 10.15446/rfmvz.v65n1.72020.