

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/236259784>

Detección de bovinos portadores e inmutoleros al virus de la diarrea viral bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana, Chile.

Article in Archivos de Medicina Veterinaria · January 1998

DOI: 10.4067/S0301-732X1998000100014

CITATIONS

7

READS

54

4 authors, including:



José Pizarro-Lucero
University of Chile

26 PUBLICATIONS 405 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Molecular characterization of pestiviruses from domestic and wild animals in Chile [View project](#)

Detección de bovinos portadores e inmunotolerantes al virus de la diarrea viral bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile*

M. CELEDON¹, M.V., M.S.; J. CARBONELL¹, M.V.; L. IBARRA¹, M.V., Mg. Bioest.; J. PIZARRO¹, B.Q., Dr. Cs.

¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Casilla 2, Correo 15, Santiago, Chile.

SUMMARY

Identification of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected immunotolerant cows in herds of the Region Metropolitana, Chile

The presence of immunotolerant, persistently infected (IPI) animals with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) was detected in several milking herds with abortions, repeat breeders, still births and poor growth rates, by the virus isolation test and measurement of serum neutralising antibodies, in 2 blood samples from each animal. Samples were taken 3 month apart.

Virus isolation was done by inoculation of the plasma and lymphocytes from peripheral blood in primary bovine testicle cell culture. The isolates were identified, on the second serial passage, by the indirect immunoperoxidase test. Cows were considered IPI when BVDV was isolated in the two blood samples and serum titre neutralising antibodies were <8 .

BVDV was isolated twice from 42 cows out of 238 (18% IPI). 22/34 herds had IPI animals (65%). There were differences in the frequency of isolations ($p>0.05$) in age averages between IPI and non IPI cows.

It is concluded that isolations of BVDV were high and that there is a high frequency of IPI cows in dairy herds from the Region Metropolitana in Chile, suspected of carrying IPI animals.

Palabras claves: diarrea viral bovina, portadores inmunotolerantes.

Key words: Bovine viral diarrhoea virus, immunotolerant persistently infected.

INTRODUCCION

La diarrea viral bovina/enfermedad de las mucosas (DVB/EM), provocada por un pestivirus de la familia Flaviviridae, denominado virus diarrea viral bovina (VDVB), se describe en Chile desde el año 1986 (Reinhardt y col., 1986).

La fuente de contagio del VDVB se debe a las secreciones y excreciones procedentes de animales virémicos, así como a los preparados biológi-

cos e instrumentos contaminados con el virus utilizados en los animales.

Al respecto, se destaca que la presencia de bovinos portadores e inmunotolerantes (PIT) al VDVB en un rebaño constituye la principal fuente de diseminación del virus (Ames, 1986).

La condición de PIT se adquiere cuando el animal, en etapa de gestación, de menos de 120 días, sobrevive a la infección por el VDVB, situación que conduce al nacimiento de un animal portador y eliminador permanente del VDVB en ausencia o con bajos títulos de anticuerpos para este virus (McClurkin y col., 1984).

En un programa de control de la DVB/EM es fundamental eliminar a los animales PIT del re-

Aceptado: 16.01.1998.

* Trabajo financiado por el Departamento Técnico de Investigación de la Universidad de Chile. Proyecto A 3141.

baño y la mejor forma de identificarlos es mediante la detección de la viremia persistente en ausencia o bajos títulos de anticuerpos para el VDVB. Como los animales no manifiestan una sintomatología clínica evidente sólo se sospecha de su presencia cuando en el rebaño se observan animales que presentan, ya sea retraso en el desarrollo, bajos niveles de productividad, baja fertilidad, aborto, mortalidad perinatal o nacimiento de crías con defectos congénitos (Bezek y Mechor, 1992). No obstante lo anterior, el animal PIT está expuesto a hacer un cuadro de EM, de presentación clínica característica y que es 100 por ciento mortal. La EM ocurre sólo si se produce una mutación del virus que el animal persistentemente infectado porta —de biotipo no citopático a citopático—, o cuando se sobreinfecta con una cepa exógena citopática (Ames, 1986).

En Chile no se ha buscado la existencia de bovinos PIT al VDVB, pero se sospecha de su presencia en los rebaños, debido a que existe una alta prevalencia serológica en bovinos de diferentes regiones del país (Reinhardt y col., 1990; Celedón y col., 1996, 1997a) y al aislamiento frecuente del virus desde animales naturalmente infectados (Reinhardt y col., 1986; Reinhardt, 1992; Celedón, 1993; Meléndez y Celedón, 1995; Celedón y col., 1997b; Galletti Vernazzani, 1997).

En este trabajo se implementa una técnica para pesquisar bovinos PIT, sospechosos de estar en esta condición, a través de la detección de viremia persistente y ausencia o bajos títulos de anticuerpos para el VDVB.

MATERIAL Y METODOS

La viremia persistente se pesquisó a través del aislamiento viral (AV) desde 2 muestras de sangre tomadas, desde un mismo animal, con tres meses de separación. La cuantificación de anticuerpos se efectuó por prueba de seroneutralización (SN) en muestras de suero tomadas en los mismos tiempos en que se tomó la muestra para AV.

Muestras. Se seleccionaron 238 bovinos pertenecientes a 34 rebaños productores de leche de diferentes predios de la Región Metropolitana, con antecedentes que hacían sospechar de la presencia de animales PIT al VDVB en el predio. De los animales seleccionados 124 correspondían a vacas con antecedentes, ya sea de abortos, muer-

tes perinatales, nacimiento de crías malformadas y/o débiles, bajos niveles de producción, "síndrome de vaca repetidora" o hijos de vacas con estos antecedentes; 74 no tenían antecedentes de signología clínica y en 40 animales se desconocían sus antecedentes.

De cada animal se tomó una muestra de sangre que se recibió en dos tubos de extracción (con y sin anticoagulante), de donde se extrajeron plasma, linfocitos y suero. En una segunda etapa, tres meses después, se sangró a todos los animales que resultaron virémicos en el primer muestreo.

Procesamiento de las muestras. El plasma y la capa flogística se extrajeron partir de la muestra de sangre obtenida con anticoagulante (heparina), por centrifugación a 1.000 x g. Las células de la capa flogística se suspendieron en 1 ml de solución "buffer" fosfato 0.01 M, pH 7.2, se depositaron sobre una columna de 4 cm de Ficoll-Hypaque (densidad 1.074) y se centrifugaron a 1.500 x g por 30 minutos, lográndose establecer una gradiente que permitió separar a los linfocitos, los que se lavaron por tres veces en PBS y se suspendieron en 0.5 ml de medio de cultivo mínimo esencial (MEM), adicionado de 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10% de glicerina. Las muestras de linfocitos y de plasma se conservaron a -70° C hasta el momento de ser inoculadas en cultivos celulares.

De la muestra de sangre obtenida sin anticoagulante se extrajo el suero, el que se inactivó por calentamiento a 56° C por 30 minutos y se conservó a -20° C.

Aislamiento viral e identificación de los aislados. Para el AV se emplearon cultivos primarios de testículo de bovino, en su cuarto pasaje, probados de estar libres de contaminación por prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IPI) (IPEX-BVDV, Central Veterinary Laboratory, Weybridge). De cada muestra se tomaron 300 ul de plasma, los que se inocularon sobre una monocapa de 400.000 células a 24 horas de ser sembradas y cultivadas en MEM, adicionados de un 10% de SFB, 100 ug de estreptomycin y 100 UI de penicilina. Después de un período de adsorción de 90 minutos a 25° C, se eliminó el inóculo, se lavó la monocapa con solución salina A de Puck (Puck y col., 1961) y se adicionaron 300 ul de la suspensión de linfocitos, incubándose por 20 horas a 37° C; posteriormente se adicionó

MEM con antibióticos, sin SFB, y se mantuvo a 37° C por 96 horas, haciéndose observaciones diarias de la monocapa celular. Al final de este período los cultivos celulares se congelaron y descongelaron por tres veces consecutivas a modo de lisar las células y liberar el posible virus multiplicado y de ubicación intracitoplasmática.

Para evidenciar la presencia del supuesto aislado se aplicó la prueba de IPI sobre las células infectadas; para ello, los lisados obtenidos del primer pasaje, en cultivos celulares, se inocularon sobre monocapas de células dispuestas en microplacas de 96 pocillos, inoculándose 6 pocillos por cada muestra con un volumen de 50 ul por pocillo. Después de un período de adsorción de 90 minutos a 25° C, se adicionó MEM con antibióticos, sin SFB, y se incubó por 48 horas a 37° C; al final de este período se eliminó el medio de cultivo, se lavó la monocapa con PBS 0.01 M pH 7.6 y las células se fijaron con acetona al 10% en PBS 0.01 M pH 7.6 por 5 minutos, para aplicar sobre éstas la prueba de IPI. En cada microplaca se infectaron células con VDVB y se dejaron células sin infectar a modo de control positivo y negativo, respectivamente.

La prueba de IPI consistió en detectar la presencia de antígenos virales de ubicación intracitoplasmática, a través del empleo de una mezcla de 4 anticuerpos monoclonales, elaborados en ratón, dirigidos contra la proteína mayoritaria del virión (gp 53). Después de sucesivos lavados y de la adición de un conjugado de conejo anti-ratón unido a peroxidasa de rábano picante, que actuó sobre el sustrato diaminobencidina, se observaron manchas de color marrón de ubicación intracitoplasmática en las células infectadas con el VDVB y con los aislados, identificándose a éstos como muestras positivas al VDVB y por consiguiente al animal virémico.

Identificación y cuantificación de anticuerpos. Para cada animal virémico se identificó y cuantificó la presencia de anticuerpos seroneutralizantes, para lo cual diluciones del suero, desde 1:2 hasta 1:128, en volúmenes de 50 ul se enfrentaron a iguales volúmenes de una suspensión viral citopatogénica, cepa Singer, conteniendo 200 dosis infectante cultivo de tejido 50% (DICT50). Después de incubar 90 minutos a 25° C, a cada pocillo de la microplaca (donde se efectuó la mezcla suero virus), se adicionó un volumen de 100 ul de una suspensión celular con

una concentración de 300.000 células por ml adicionada de un 20% de SFB y antibióticos. Paralelamente se controló la viabilidad y proliferación celular, la citotoxicidad del suero, el título del virus y las DICT50. La microplaca se incubó a 37° C por un período de 5 días haciéndose observaciones microscópicas diarias. El título del suero se expresó como el valor recíproco de la dilución de suero que es capaz de neutralizar el efecto citopático producido por 100 DICT50 de virus.

A los animales que resultaron virémicos en un primer muestreo se les tomó una segunda muestra de sangre tres meses después y se procedió de igual forma que en el primer muestreo. Se consideró animal PIT al que en las dos muestras de sangre se le detectó la presencia de virus y los anticuerpos para el VDVB se mantuvieron con títulos <8.

RESULTADOS

De los 34 predios muestreados, en 22 se detectaron bovinos PIT, lo que corresponde a una prevalencia predial de un 65%. De los 238 bovinos seleccionados en 97 se pudo pesquisar el VDVB en un primer muestreo, lo que corresponde a un 41% de positividad. Todos los sueros de estos animales presentaron títulos de anticuerpos neutralizantes menores que 8. En el segundo muestreo sólo se pudo ubicar a 59 animales, de los 97 virémicos al primer muestreo. La diferencia fue producto de muerte natural, sacrificio, venta o traslado de animales.

Con las 59 muestras recuperadas en el segundo muestreo, en que 42 resultaron positivas al aislamiento viral y con títulos de anticuerpos seroneutralizantes menores que 8, se pudo establecer que existe un 18% de PIT al VDVB en predios sospechosos de poseer animales en esta condición en la Región Metropolitana (cuadro 1).

En base a los antecedentes clínicos, recopilados en el momento de tomar la primera muestra, se pudo observar que de los 124 animales con antecedentes de signos clínicos, 36 (29%) resultaron positivos al aislamiento viral y 88 (71%) resultaron negativos; de los 74 animales con antecedentes de no mostrar signos clínicos de enfermedad 49 (66%) resultaron positivos al aislamiento y 25 (34%) negativos; y de los 40 animales en que se desconocían sus antecedentes clínicos

Cuadro 1

Prevalencias predial e intrapredial de vacas portadoras e inmunotolerantes al virus de la diarrea viral bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile.
Prevalence of persistently infected cows with bovine viral diarrhoea virus in dairy herds in the Region Metropolitana of Chile.

Categoría	Portadores inmunotolerantes			
	Predial		Intrapredial	
	Nº	%	Nº	%
Positivos	22	65	42	18
Negativos	12	35	196	82
Total	34	100	238	100

cos, 12 (30%) resultaron positivos al aislamiento viral y 28 (70%) fueron negativos (cuadro 2).

Referente a los resultados obtenidos en el segundo muestreo, en que se sangraron 59 animales que fueron virémicos al primer muestreo, en el grupo en que se tenían antecedentes clínicos de enfermedad, 12 de 22 resultaron positivos al aislamiento viral; en el grupo con antecedentes de no mostrar signos clínicos de enfermedad, 27 de 33 resultaron positivos al aislamiento viral; y en el grupo en que se desconocían sus antecedentes clínicos 3 de 4 animales resultaron positivos al aislamiento viral (cuadro 2).

Con respecto al signo clínico, en el grupo de animales con antecedentes, el aborto fue el que presentó mayor frecuencia (60 de 124 en el primer muestreo, con un 35% de positividad y 9 de 12 en el segundo muestreo con un 60% de positividad).

No obstante lo anterior, la mayor cantidad de bovinos con infección persistente se registró en los animales con antecedentes de no mostrar signos clínicos asociados a la enfermedad, encontrándose diferencias significativas con los que registraban algún signo clínico ($p < 0.05$) (cuadro 2).

Según la distribución de los animales por sus edades, la mayor frecuencia de muestras se obtuvo de animales de 3 a 8 años, observándose en este rango la mayor positividad, en el primer y segundo muestreo. Al comparar las edades pro-

medios de los bovinos PIT con los no PIT no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) (cuadro 3).

DISCUSION

En este estudio se adoptó el procedimiento de AV y cuantificación de anticuerpos por SN para identificar PIT al VDVB, ya que está descrito como el método más adecuado y confiable (Bezek y Mechor, 1992). Otro procedimiento consiste en evaluar la respuesta de anticuerpos frente a una vacunación con el VDVB, pero esta medición es poco confiable dado que algunos animales PIT responden adecuadamente a la vacunación y algunos animales inmunocompetentes pueden no responder (Bolin, 1988). No obstante, Hanel y col. (1995) cuestionan la prueba de AV como método de diagnóstico para la detección del VDVB, por la posibilidad de que el SFB y/o las células empleadas estén contaminados con el VDVB. En este trabajo esta situación fue superada, puesto que los cultivos celulares empleados fueron controlados repetidamente, a la vez que se empleó un SFB comercial certificado como libre de VDVB y probado de estar en tal condición.

La alta frecuencia de AV podría explicarse por el método empleado, dado que de la muestra en estudio se intentó pesquisar el virus que se encontraba libre en el plasma, así como el asociado

Cuadro 2

Aislamiento de virus diarrea viral bovina (VDVB) de vacas lecheras de la Región Metropolitana, en dos muestreos según antecedentes de signos clínicos.

Isolation of the bovine viral diarrhoea virus from dairy cows of Region Metropolitana, Chile

Antecedentes de signos clínicos	Aislamiento e identificación de VDVB											
	Muestra 1						Muestra 2					
	Positivos		Negativos		Total		Positivos		Negativos		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Aborto	21	35	39	65	60	100	9	60	6	40	15	100
Vaca repetidora	4	16	21	84	25	100	0	0	0	0	0	100
Muerte neonatal	4	31	9	69	13	100	2	67	1	33	3	100
Malformaciones	1	20	4	80	5	100	1	100	0	0	1	100
Feto momificado	0	0	1	100	1	100	0	0	0	0	0	100
Más de 1 signo	6	30	14	70	20	100	0	0	3	100	3	100
Sin signos	49	66	25	34	74	100	27	82	6	18	33	100
Sin registro	12	30	28	70	40	100	3	75	1	25	4	100
Total	97	41	141	59	238	100	42	71	17	29	59	100

Cuadro 3

Aislamiento del virus diarrea viral bovina (VDVB) de vacas lecheras de la Región Metropolitana en dos muestreos según edad.

Isolation of the bovine viral diarrhoea virus from dairy cows of Region Metropolitana, Chile, according to age.

Edad (años)	Aislamiento e identificación de VDVB											
	Muestra 1						Muestra 2					
	Positivos		Negativos		Total		Positivos		Negativos		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1 a 2	7	12	15	68	22	100	5	100	0	0	5	100
3 a 8	64	47	71	53	135	100	31	72	12	28	43	100
> de 9	8	44	10	56	18	100	2	50	2	50	4	100
Desconocido	18	29	45	71	63	100	4	67	2	33	6	100
Total	97	41	141	59	238	100	42	71	17	29	59	100

a linfocitos, se estima que sólo el 4.4% de los leucocitos sanguíneos están infectados con virus (Bolin y col., 1987); una vez efectuado un primer pasaje del supuesto aislado, las células se lisaron para rescatar el virus de ubicación intracelular; se mantuvieron largos períodos de incubación entre células (linfocitos con el cultivo celular) a modo de facilitar el contacto entre ellas; y se usó SFB desprovisto de anticuerpos para el VDVB en el proceso de crecimiento y mantención de los cultivos celulares.

En este estudio se pesquió una prevalencia de PIT animal de 18% y predial de 65%, valor que puede estar subestimado, por cuanto 38 de 97 animales virémicos en un primer muestreo no pudieron ser diagnosticados en una segunda oportunidad. Este valor parece elevado, ya que si bien en la literatura no son frecuentes las mediciones de prevalencia de PIT, se registran datos de un 1% en Dinamarca (Meyling y col., 1990), de un 1% a 5% de animales de algunos rebaños de Australia (Littlejohns y Horner, 1990), de un 9% (6/66) de rebaños con un 1.7% (54/3.157) de animales en Estados Unidos de Norteamérica (Baker, 1987). Datos registrados de toros de un centro de inseminación artificial del Reino Unido entregan valores de 0.78% (Howard y col., 1990) y Waxweiler y col. (1992) en un estudio de 5 años en un centro de selección de toros en Bélgica no detectaron más de un 1% de PIT. No obstante estas bajas prevalencias detectadas, Bolin y col. (1985) y Taylor y col. (1994) describen valores tan altos como de un 27 y 28%, respectivamente, en rebaños individuales.

La alta prevalencia de PIT detectada en este estudio podría explicarse por el hecho de que el 76% de las muestras fueron tomadas de 28 predios de pequeños productores de una comuna de la Región Metropolitana, en que no se disponía de asistencia médico veterinaria, con malas condiciones sanitarias, gran intercambio de animales entre predios, uso de monta natural con un mismo toro en diferentes predios, y además en estos predios la mayor parte del muestreo estuvo orientada a bovinos que hacían sospechar de la condición de ser PIT. Por el contrario, las muestras tomadas desde 6 predios con asistencia médico veterinaria y con mejores condiciones de manejo no evidenciaron la presencia de animales PIT. Esta situación, sumada a los datos de prevalencias antes mencionadas, hace suponer que la frecuencia de PIT en un rebaño está fuertemente

influenciada por las condiciones de manejo, puesto que el surgimiento de PIT está determinado por la frecuencia con la cual las hembras son infectadas al principio de la preñez. Cabe destacar que en los predios en que no se detectó la presencia de animales virémicos, no se investigó la existencia de anticuerpos para el VDVB, lo que impide argumentar si la no detección de PIT se debió al azar o a predios libres de VDVB.

El hecho de haber detectado una mayor frecuencia de animales PIT en el grupo sin antecedentes de haber mostrado signología que hiciera sospechar de tal condición, con respecto al grupo de animales con antecedentes, puede ser cuestionada puesto que el 100% de los PIT se obtuvieron de los predios sin asistencia médico veterinaria, donde no se disponía de fichas clínicas y sólo se obtuvieron antecedentes aportados por la observación y memoria de los dueños de los animales. No obstante, la literatura señala que los animales PIT en un rebaño no necesariamente manifiestan algún signo que los haga sospechosos (Bolin, 1990; Brownlie, 1990; Shimizu, 1990; Bezek y Mechor, 1992).

En este trabajo no se encontró diferencia entre la edad promedio de los bovinos PIT con los no PIT, a pesar de que hubo una mayor cantidad de muestras tomadas desde animales de 2 a 8 años y en este grupo hubo una mayor frecuencia de positivos; al respecto es reconocido que la prevalencia de PIT decrece con la edad del rebaño (Littlejohns y Horner, 1990).

Se concluye que la técnica implementada para detectar animales PIT fue apropiada y que existe una alta prevalencia animal y predial de animales PIT en predios lecheros de pequeños productores de la Región Metropolitana, sin asistencia médico veterinaria, en que se sospecha de poseer animales en dicha condición, no encontrándose animales PIT en predios de la misma región con asistencia médico veterinaria y mejores condiciones sanitarias.

RESUMEN

Se implementó una técnica para detectar la presencia de bovinos portadores e inmunotolerantes (PIT) al virus de la diarrea viral bovina (VDVB), a través de la pesquisa de viremia persistente y bajos títulos de anticuerpos, para el VDVB, en dos muestras de sangre tomadas,

desde un mismo animal, con tres meses de separación.

La presencia de virus en la sangre se evidenció a través del aislamiento viral (AV) —desde muestras de plasma y linfocitos— en cultivos primarios de testículo bovino y la identificación del supuesto aislado se efectuó por prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IPI) en el segundo pasaje del inóculo sobre las células. La detección de anticuerpos séricos se realizó por prueba de seroneutralización (SN), empleando la cepa citopatogénica Singer del VDVB. Se consideró animal PIT al que evidenció presencia de virus en las 2 muestras de sangre y mantuvo títulos de anticuerpos menores o iguales a 8.

De 238 bovinos muestreados en 42 se detectó viremia persistente en ausencia o bajos títulos de anticuerpos, considerándose una prevalencia de 18% de bovinos PIT, y de los 34 predios muestreados en 22 se detectó la presencia de animales PIT, considerándose una prevalencia predial de 65%.

Hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los animales PIT con signología clínica de enfermedad y los que no registraban signos clínicos, presentándose mayor frecuencia de PIT en los animales sin signos clínicos. No hubo diferencias ($p > 0.05$) entre las edades promedios de los bovinos PIT con los no PIT.

Se concluye que la técnica implementada fue efectiva para diagnosticar bovinos PIT al VDVB y que existe una alta prevalencia de PIT al VDVB por animal y predial, en predios lecheros de la Región Metropolitana sospechosos de contener animales PIT.

BIBLIOGRAFIA

- AMES, T.R. 1986. The causative agent of BVD: Its epidemiology and pathogenesis, *Vet. Med.* 81: 848-869.
- BAKER, J.C. 1987. Bovine viral diarrhea virus: A review, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190: 1449-1458.
- BEZEK, D.M., G.D. MECHOR. 1992. Identification and eradication of bovine viral diarrhea virus in a persistently infected dairy herd, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201: 580-586.
- BOLIN, S.R. 1988. Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhea virus, *Am. J. Vet. Res.* 49: 1040-1044.
- BOLIN, S.R. 1990. Control of bovine virus diarrhoea virus, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 9: 163-171.
- BOLIN, S.R., A.W. McKLURKIN, M.F. CORIA. 1985. Frequency of persistent bovine viral diarrhea virus infection in selected cattle herds, *Am. J. Vet. Res.* 46: 2385-2387.
- BOLIN, S.R., J.M. SACKS, S.V. CROWDER. 1987. Frequency of association of noncytopathic bovine viral diarrhea virus with mononuclear leukocytes from persistently infected cattle, *Am. J. Vet. Res.* 48: 1441-1445.
- BROWNLIE, J. 1990. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 9: 43-59.
- CELEDON, M.O. 1993. Nuevos antecedentes en el comportamiento del virus de la diarrea viral bovina. Situación en Chile, *Av. Cs. Vet.* 8: 11-17.
- CELEDON, M.O., C. VARGAS, A. SALINAS, A. CASANOVA, L. IBARRA, P. BERRIOS. 1996. Prevalencias serológicas para el virus de la diarrea viral bovina y de la rinotraqueítis infecciosa bovina en ganado lechero de la Región Metropolitana de Chile, *Av. Cs. Vet.* 11: 75-80.
- CELEDON, M., L. PALACIOS, J. PIZARRO, L. IBARRA. 1997a. Prevalencia de anticuerpos seroneutralizantes para el virus de la diarrea viral bovina en ganado de carne de la Región Metropolitana de Chile, *Av. Cs. Vet.* (en arbitraje).
- CELEDON, M.O., L. ROCO, G. QUINTEROS, M. SANTIBAÑEZ, P. BERRIOS. 1997b. Puesta en evidencia del virus diarrea viral bovina en bovinos clínicamente afectados, *Arch. Med. Vet.* 29 (2): 189-195.
- GALLETI VERNAZZANI, E. 1997. Relación del virus diarrea viral bovina con aborto y/o síndrome de vaca repetidora en bovinos serológicamente negativos a brucelosis. Memoria Título Med. Vet., U. de Chile, 53 pp.
- HARNEL, A.L., M.D. WASYLYSHEN, G.P. NAYAR. 1995. Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by using RNA, extracted directly from assorted specimens and a one tube reverse transcription PCR assay, *J. Clin. Microbiol.* 33: 287-291.
- HOWARD, T.H., B. BEAN, R. HILLMAN, D.R. MONKE. 1990. Surveillance for persistent bovine viral diarrhea virus infection in four artificial insemination centers, *J. Am. Vet. Med. Ass.* 196: 1951-1955.
- LITTLEJOHNS, I.R., G.W. HORNER. 1990. Incidence, epidemiology and control of bovine pestivirus infections and disease in Australia and New Zealand, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 9: 195-205.
- McKLURKIN, A.W., E.T. LITLEDIKE, R.C. CUTLIP, G.H. FRANK, M.F. CORIA, S.R. BOLIN. 1984. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus, *Canad. J. Comp. Med.* 48: 156-161.

- MELENDEZ, P., M.O. CELEDON. 1995. Pesquisa del virus diarrea viral bovina desde un cuadro respiratorio atípico en novillo, *Av. Cs. Vet.* 10: 83-85.
- MEYLING, A., H. HOUE, A.M. JENSEN. 1990. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 9: 75-93.
- PUCK, T.T., S.J. CIENVRA, A. ROBINSON. 1961. Genetic of somatic mammalian cells, *J. Exp. Med.* 33: 339-349.
- REINHARDT, G. 1992. Diarrea viral bovina/enfermedad mucosa, una enfermedad viral compleja, *Monografías Med. Vet.* 14: 49-55.
- REINHARDT, G., S. RIEDEMANN, H. FIEDLER, M. NIEDDA, M. AGUILAR, V. CUBILLOS, E. PAREDES. 1986. Diarrea viral bovina/enfermedad mucosa. Primer aislamiento del agente causal en Chile, *Arch. Med. Vet.* 18: 157-161.
- REINHARDT, G., S. RIEDEMANN, S. ERNST, M. AGUILAR, R. ENRIQUEZ, J. GALLARDO. 1990. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea/mucosal disease in southern Chile, *Prev. Vet. Med.* 10: 73-78.
- SHIMIZU, M. 1990. Current situation of bovine virus diarrhoeamucosal disease (BVD-MD) virus infections and their antigenic diversity in Hokkaido, Japan, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 9: 181-194.
- TAYLOR, L.F., J. VAN DONKERSGOED, O.M. RADOSTITS, C.W. BOOKER, E.J. DUBOVI, J.V. VAN DEN HURK, E.D. JANZEN. 1994. Investigation of an outbreak of mucosal disease in a beef cattle herd in southwestern Saskatchewan, *Can. Vet. J.* 35: 425-432.
- WAXWEILER, S., B.T.L. KARELLE, D. BOULANGER, B. MIGNON, E. ERNST, G. DETAL, F. BOONEN. P.P. PASTORET. 1992. Bilan de cinq années de détection des taurillons infectés de manière persistante par le virus BVD au centre de sélection bovine de Ciney, *Ann. Méd. Vét* 136: 57-60.