



Archivos de Medicina Veterinaria
ISSN: 0301-732X
archmv@uach.cl
Universidad Austral de Chile
Chile

RONCHI, J.I.; ESTELA, E.S.; LEUNDA, M. R.; ODEON, A. C.
Infección experimental con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) genotipo 2 en terneros con
anticuerpos neutralizantes al VDVB genotipo 1
Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 33, núm. 2, 2001
Universidad Austral de Chile
Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013680007>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

The screenshot shows the homepage of the Revistas Electrónicas UACH. At the top, there's a banner with the text "Revistas Electrónicas UACH". Below the banner, there are several navigation links: "Inicio Web Revistas", "Web Biblioteca", "Contacto", "Artículos", "Búsqueda artículos", "Tabla de contenido", "Anterior", "Próximo", "Autor", "Materia", "Búsqueda", "Inicio", and "Lista". To the left, there's a thumbnail image of the journal cover for "Archivos de Medicina Veterinaria". To the right, there are four icons with corresponding text: "Como citar este artículo", "Aregar a favoritos", "Enviar a e-mail", and "Imprimir HTML".

Arch. med. vet. v.33 n.2 Valdivia 2001

Infección experimental con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) genotipo 2 en terneros con anticuerpos neutralizantes al VDVB genotipo 1

Experimental infection with bovine viral diarrhea virus (BVDV) genotype 2 in calves with neutralizing antibodies to BVDV genotype 1

J.I. RONCHI¹, M.V., Esp. Salud Anim.; E.S. ESTELA², M.V., Esp. Salud Anim.; M. R. LEUNDA¹, A. C. ODEON¹, M.V., Dr. Cs. Vet., M. Sc., Ph.D.

¹: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, C.C. 276 - (7620) Balcarce, Bs.As., Argentina, ²: Facultad de Ciencias Veterinarias, Tandil, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires (UNCBA), Argentina.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the consequences of the infection of BVDV genotype II (BVDV-2) in calves with preexisting immunity to BVDV-1 (induced by infection with wild type BVDV (Group A, 4 calves), or induced by vaccination with a killed BVDV-1 product (Group B, 2 calves). Group A and B were intranasally exposed to a field isolate of BVDV-2 (25ml x 10^{-7.8} TCID₅₀/ml). Calves of Group A had erosions on the oral mucosa from 3 to 4 day post-challenge (DPC); moreover, intense salivation, mucous nasal secretion and sporadic diarrhea were observed from 4-14 DPC. Only one calf of Group B had diarrhea at 5 DPC. The average value of peripheral blood leukocytes (PBL) previous to BVDV-2 challenge was 8,775 PBL/ml (± 603) in calves of Group A and 9,975 PBL/ml (± 1308) in calves of Group B. After BVDV-2 challenge there was leukopenia in Groups A and B. The minimal number of PBL of 5,875 PBL/ml (± 311) was observed in Group A at 6 PDC ($P < 0.05$). There were differences ($P < 0.05$) in the average of PBL during the 17 DPC among challenged animals and uninfected controls. Moreover, a difference in the number of blood lymphocytes was observed at 6-7 DPC between virus exposed and control calves. BVDV was isolated from ocular swabs of 3 calves of Group A at 13 and 17 DPC and from PBL at 9 and 11 DPC. The neutralizing antibody titer (NT) to both genotypes of BVDV was higher ($P < 0.05$) in calves of Group A. Previous to virus challenge calves in this group had NT of 1:125 (geometric mean) and 1:128 to BVDV-1 and -II, respectively. The NT rose to 1:2048 at 17 DPC to both Genotypes of BVDV. Calves in Group B had a NT of 1:16 to both BVDV-1 and -II previous to BVDV-2 challenge. At 17 DPC the NT rose to 1:64 and to 1:181 to BVDV-1 and -II, respectively. These results allow us to conclude that antibodies generated by natural infection or vaccination with BVDV-1 increased for BVDV-1 and -2 after the experimental challenge with BVDV-2.

Palabras claves: Virus de la Diarrea Viral Bovina, VDVB, infección experimental genotipos, inmunidad, vacuna inactivada

Keywords: Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV, Experimental Infection, Genotypes, Immunity, Killed Vaccine

INTRODUCCIÓN

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un importante patógeno del ganado bovino en la mayoría de los países con

poseen la característica de ser altamente virulentas, causando una infección aguda severa, muy similar a la enfermedad de las mucosas, en bovinos seronegativos e inmunocompetentes ([Odeón y col., 1999](#)). En la última década se han detectado brotes severos de enfermedad causados por VDVB-2 en EE.UU. ([Rebhun y col., 1989](#)), Gran Bretaña ([David y col., 1994](#)), Francia ([Broes y col., 1992](#)) y Canadá ([Carman y col., 1998](#)). El VDVB-2 ha sido identificado recientemente en Argentina como responsable de cuadros fatales en bovinos mayores de 6 meses de edad ([Odeón y col., 1998](#)). Teniendo en cuenta que a la fecha no existen vacunas comerciales que hayan incorporado VDVB-2 en su formulación en Argentina, se plantea el siguiente trabajo, cuyo objetivo es determinar las consecuencias de la infección con el VDVB-2 en terneros con anticuerpos neutralizantes -infectivos o vacunales- contra el VDVB-1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental. Para cumplir con el objetivo del trabajo se utilizaron ocho bovinos, razas A. Angus y A. Angus x Hereford, de 7 - 9 meses de edad, asignados a los siguientes tratamientos: Grupo A: cuatro animales seropositivos VDVB-1 (N° 005, 014, 0187, 8202); Grupo B: dos animales vacunados contra VDVB-1 (N° 8322, 8430) y Grupo C: dos animales controles, seronegativos, no vacunados (N° 8103, 8345). Previo al experimento se comprobó que los animales no estaban persistentemente infectados con VDVB. Los animales del Grupo A eran seropositivos a VDVB-1, ya que 60 días previos al estudio cursaron una forma subclínica de diarrea viral bovina. Los animales del Grupo B eran seronegativos y recibieron dos dosis de una vacuna comercial inactivada de VDVB-1 por vía intramuscular con un intervalo de 21 días. La segunda dosis fue administrada 21 días antes de la infección experimental con VDVB-2. Los animales de los Grupos A y B fueron desafiados intransalmente con VDVB-2. Todos los animales fueron controlados clínicamente y muestrados (sangre con EDTA y sin anticoagulante, e hisopados oculares) diariamente durante 17 días post-desafío (DPD).

Inóculo. Se empleó una cepa NCP del VDVB, designada como 98/124, que fue aislada de un caso severo de enteritis hemorrágica en bovinos de 18 meses en el partido de Necochea, provincia de Buenos Aires, en 1998. La caracterización molecular del segmento 5'UTR de dicho aislamiento reveló que la cepa 98/124 era similar a otros VDVB-2 ([Odeón y col., 1998](#)). El virus fue propagado 3 veces en células *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK) para generar un inóculo con una infectividad de $10^{-7.8}$ TCID₅₀/ml. Los animales de los Grupos A y B fueron desafiados intransalmente con 25 ml de dicho inóculo.

Temperatura corporal y curso clínico. A todos los animales se les registró la temperatura rectal 2 veces por día (matutina y vespertina), procediéndose a su observación clínica.

Recuento leucocitario. Desde el día desafío (0 DPD) y durante 17 días, se procedió a la extracción diaria de sangre con anticoagulante (EDTA) por punción yugular para el estudio de citología sanguínea mediante recuento leucocitario total y diferencial ([Schalm, 1965](#)).

Serología. En las muestras de suero obtenidas los 0, 7, 14 y 17 DPD se determinaron anticuerpos neutralizantes a VDVB-1 y VDVB-2, realizándose la prueba de seroneutralización (SN) en microplacas con virus fijo y suero variable, utilizando una cepa de referencia de VDVB-1, NADL (virus heterólogo) y la cepa de VDVB-2 inoculada (virus homólogo).

Aislamiento viral. El aislamiento viral se realizó a partir de leucocitos y de hisopados oculares en células MDBK con medio MEM-Hank's con suero fetal bovino. Los leucocitos fueron obtenidos por centrifugación de sangre con anticoagulante (EDTA), separados en Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich Corp. EE.UU.), lavados en PBS (pH 7,3) y co-cultivados en células MDBK, con 7% de suero fetal bovino. Luego de cuatro pasajes ciegos, la presencia del virus en los cultivos de leucocitos e hisopados oculares fue confirmada mediante inmunofluorescencia directa (IFD), empleándose un antisuero polyclonal conjugado con fluoresceína, siguiendo las instrucciones del fabricante (American BioResearch, EE.UU.).

Análisis estadístico.- Se compararon las diferencias entre las medias (*test* de Duncan) de los datos de cada grupo experimental mediante ANOVA utilizando el procedimiento GLM. Los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS/STAT *Release 6.03*, (SAS Int. Inc., Cary, NC, 1995).

RESULTADOS

Temperatura y curso clínico. No se observaron diferencias significativas en los registros de temperatura corporal de los grupos experimentales durante los 17 días de observación. En todos los animales del Grupo A se detectaron petequias y erosiones orales leves, de 2 - 5 mm de diámetro, en la mucosa gingival y en carrillos entre los 3 y 9 DPD. Además, se observó epifora, secreción nasal mucosa y diarrea leve e intermitente desde el 4 hasta el 14 DPD. En los animales del Grupo B se observó diarrea leve en un animal (8430) el 5 DPD. Los animales del Grupo C, controles no desafiados, no presentaron síntomas clínicos.

Recuento leucocitario. En el [gráfico 1](#) se detallan los resultados del recuento leucocitario total de cada grupo experimental durante todo el experimento. El valor promedio de leucocitos totales circulantes previo al desafío fue de 8,775 Le/ml (± 603) para el Grupo A y de 9,975 Le/ml (± 1.308) para el Grupo B y de 7,450 Le/ml (± 212) para el Grupo C. Luego del desafío con el VDVB-2 se registró leucopenia en los Grupos A y B ([cuadro 1](#)). El valor mínimo de leucocitos circulantes fue observado en el Grupo A, al 6 DPD con 5875 Le/ml (± 311), estos valores resultaron significativos ($P < 0,05$) con respecto al Grupo B y C (control), que tuvieron un recuento promedio de 6.875 Le/ml (± 625) y de 8,300 Le/ml (± 450) al 6 DPD, respectivamente. La leucopenia se mantuvo constante en el Grupo A, con diferencias significativas ($P < 0,05$) en el número promedio de leucocitos totales circulantes con respecto al control durante los 17 DPD. En el Grupo B el número de leucocitos circulantes recuperó los valores previos al desafío a partir de los 12 DPD ([gráfico 1](#)); no obstante este incremento, el valor promedio de leucocitos durante los 17 DPD difirieron significativamente con el control ($P < 0,05$) ([cuadro 1](#)).

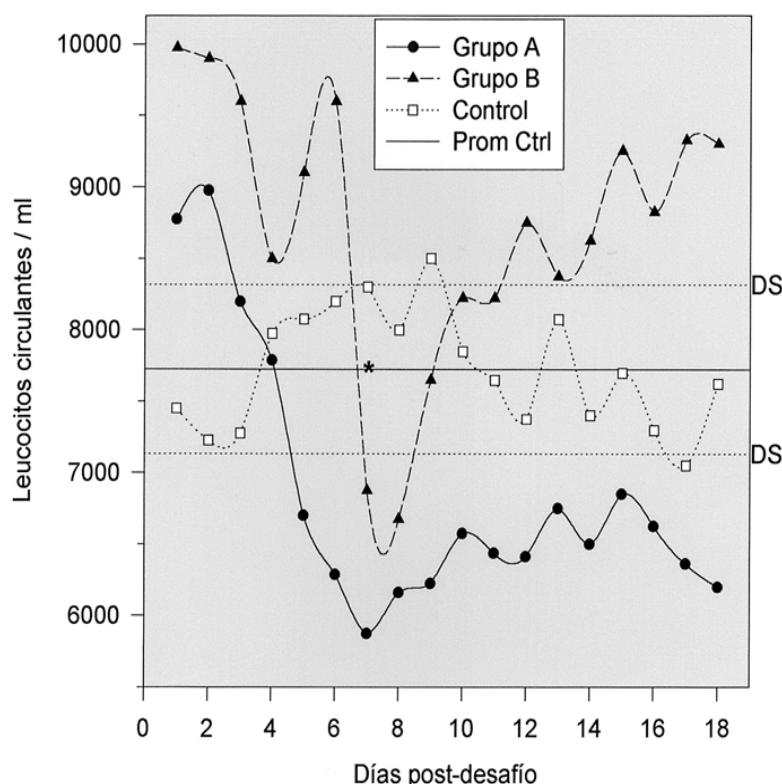
El número promedio de linfocitos circulantes previo al desafío fue de 6.173 linfocitos (Li)/ml (± 405) para el Grupo A y de 7,517 Li/ml (± 776) para el Grupo B. Si bien no se determinaron diferencias en el valor promedio de linfocitos totales circulantes durante los 17 DPD, existieron diferencias significativas ($P < 0,05$) de los Grupos desafiado con el control durante los 6 y 7 DPD ([cuadro 1](#)). Esta linfopenia resultó ser la responsable de la leucopenia detectada ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en los recuentos de neutrófilos ([cuadro 1](#)), monocitos y eosinófilos (datos no presentados).

lymphocyte counts in the experimental groups expressed as average value during the 17 days of observations and as average of the least detected value.

	Leucocitos totales / ml		Linfocitos / ml		Neutrófilos / ml	
	Promedio general 0 - 17 DPD	Promedio mínimo 6 - 9 DPD	Promedio general 0 - 17 DPD	Promedio mínimo 6 - 7 DPD	Promedio general 0 - 17 DPD	Promedio mínimo 4- 8 DPD
Grupo A	6,872 ±959 a*	6,209 ±144 a	4,880 ±213 a	4,787 ±235 a	1,168 ±106 a	1,200 ±45 a
Grupo B	7,672 ±509 b	7,737 ±590 b	4,150 ±817 a	5,402 ±29 a	1,014 ±220 a	1,559 ±288 a
Grupo C	8.801 ±970 c	8.162 ±146 b	4.804 ±399 a	6.397 ±118 b	1.321 ±81 a	1.642 ±32 a

* Columnas con distintas letras indican diferencias significativas entre Grupos ($P < 0,05$)

Aislamiento viral. En el Grupo A se aisló VDVB a partir de hisopados oculares el 13 DPD de dos animales (014 y 005) y el 17 DPD del animal 005. El 9 DPD se aisló virus a partir de leucocitos circulantes en los animales 014 y 0187 y el 11 DPD de los animales 014 y 0187. En el Grupo B no se aisló el virus inoculado.



challenge, and Group C non-BDV-challenged control. * = Indicates significance ($P < 0.05$).

Serología. Al comienzo de la experiencia se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el nivel de anticuerpos neutralizantes entre el Grupo A y B, observándose una respuesta inmune humoral significativa ($P < 0.05$), tanto para VDVB genotipo 1 y 2, en los animales del Grupo A ([cuadro 2](#)).

DISCUSIÓN

La presencia de anticuerpos neutralizantes, ya sea producto de la infección (Grupo A) o de la vacunación (Grupo B), probablemente haya condicionado el curso de la infección experimental realizada, no obstante faltó el control para afirmar esto. Si bien durante el transcurso del ensayo no se presentaron manifestaciones clínicas severas luego del desafío con VDVB-2, animales de ambos grupos presentaron síntomas leves. Considerando las observaciones clínicas y los resultados del aislamiento, en donde se determinó viremia y excreción viral intermitente en 3 de los 6 animales desafiadados, se sugiere que -junto con la viremia- la replicación viral sistémica sería un rasgo esencial en la patogénesis del VDVB y en la manifestación de síntomas de enfermedad.

Los resultados obtenidos del recuento de leucocitos circulantes coincidieron con datos previamente descriptos con otros aislamientos del VDVB, en los que se registró marcada leucopenia entre el 3 - 5 DPD, con normalización de los valores de leucocitos circulantes hacia el día 14 del ensayo ([Cortese y col., 1998a](#)). El valor de los recuentos diferenciales de leucocitos del referido trabajo tuvo una tendencia similar a este estudio, detectándose linfopenia y neutropenia a partir del día 7 - 10 post-inoculación. Se postula que factores aditivos, como nivel de cortisol y excesiva liberación repentina de ciertas citoquinas, pueden contribuir a la deplección leucocitaria en forma directa, o mediante la inducción de apoptosis de linfocitos como consecuencia de la infección con VDVB ([Cohen y Duke, 1984](#)). En tal sentido, se debe tener en cuenta que el aislamiento de VDVB a partir de leucocitos circulantes en el Grupo A a los días 9 y 11 del ensayo, indicarían una asociación entre la viremia y linfopenia observada. La ausencia de una viremia identificable en el Grupo B posiblemente haya sido un factor importante para que los animales de este grupo presenten una leucopenia moderada.

Cuadro 2. Anticuerpos neutralizantes contra BVDV genotipo 1 y 2 en los grupos experimentales después de una infección experimental con BVDV Genotipo 2.
Neutralizing antibodies to BVDV Genotype 1 and 2 in the experimental groups after BVDV Genotype 2 challenge.

	BVDV Genotipo 1				BVDV Genotipo 2				DPD 17
	DPD 0	DPD 7	DPD 14	DPD 17	DPD 0	DPD 7	DPD 14	DPD 17	
Grupo A									
005	1:16	1:16	1:32	1:32	1:16	1:16	1:1024	1:1024	
014	1:512	1:1024	1:4096	1:8192	1:256	1:512	1:4096	1:4096	
187	1:512	1:1024	1:4096	1:8192	1:256	1:256	1:1024	1:4096	
8202	1:512	1:2048	1:8192	1:8192	1:256	1:4096	1:4096	1:102	
Media geométrica	1:215	1:431	1:1448	1:2048	1:128	1:304	1:2048	1:2048	
Grupo B									
8322	1:16	1:16	1:16	1:32	1:16	1:16	1:32	1:64	
8430	1:16	1:16	1:32	1:128	1:16	1:16	1:128	1:512	
Media geométrica	1:16	1:16	1:23	1:64	1:16	1:16	1:64	1:181	

virus vivo modificado ([Cay y col., 1989](#)). Los resultados obtenidos en este estudio indican la presencia de inmunidad cruzada a virus heterólogos ya que, previo al desafío, tanto los animales expuestos naturalmente (Grupo A), como los vacunados con virus inactivado (Grupo B) genotipo 1 tenían anticuerpos contra VDVB-2, determinados mediante la prueba de seroneutralización.

Si bien todos los pestivirus comparten antígenos ([Cay y col., 1989](#)), las vacunas con virus inactivados no parecen mostrar completa protección contra cepas de virus heterólogo ([Bolin y col., 1991](#)). En el presente trabajo, la diferencia en el título de anticuerpos neutralizantes entre los animales del Grupo A (con infección natural previa) y Grupo B (vacunados) al momento del desafío, sugiere un menor estímulo en la respuesta inmune de la vacuna inactivada, en comparación con una infección natural contra ambos genotipos. Asimismo, al igual que para el caso del número de leucocitos circulantes, la ausencia de viremia detectable en el Grupo B posiblemente haya sido un factor importante que contribuyó para que estos animales tengan un menor nivel de anticuerpos al finalizar el estudio. Por otra parte, este menor título de anticuerpos neutralizantes en los animales vacunados también podría atribuirse a una menor respuesta anamnésica luego del desafío en animales inmunizados con virus inactivado ([Bolin y col., 1991](#)). Sin embargo, a pesar de tales diferencias en la inmunidad humoral, sólo un animal del Grupo B presentó diarrea leve, la leucopenia en el Grupo B fue menos severa que en el Grupo A y no fue posible determinar viremia luego del desafío en el Grupo B. Estas observaciones coinciden con estudios recientes que indican que luego de la vacunación con virus vivo modificado de VDVB-1, los terneros desarrollan respuesta inmune luego del desafío con VDVB-2 ([Martín y col., 1994](#)). Los resultados de nuestro ensayo, empleando una vacuna con virus inactivado, coinciden con dicha información; ello permitiría demostrar que bajo determinadas circunstancias animales inmunizados con VDVB-1 estarían protegidos parcialmente contra VDVB-2, demostrando que la respuesta inmune a los dos genotipos del virus sería parcialmente homóloga.

Los resultados obtenidos de este estudio permiten concluir que el nivel de anticuerpos generados por una infección o vacunación con VDVB-1 aumentan para el VDVB genotipo 1 y 2 después de una infección con VDVB-2. Adicionalmente, la infección con VDVB-2 produce leucopenia en animales previamente infectados o vacunados con VDVB-1. El bajo número de animales utilizados y la falta de un control seronegativo desafiado con BVDV-2 no permiten inferir si la presencia de dichos anticuerpos neutralizantes limitaron la infección con el BVDV-2.

RESUMEN

Se determinaron las consecuencias de la infección con VDVB genotipo 2 (VDVB-2) en terneros seropositivos a VDVB genotipo 1 (VDVB-1). Ocho bovinos no-virémicos de razas británicas de 9 meses de edad se asignaron en: Grupo A: 4 animales seropositivos a VDVB; Grupo B: 2 animales inmunizados con VDVB-1 inactivado y Grupo C: 2 animales controles. Los Grupos A y B fueron desafiados intranasalmente con VDVB-2, $10^{-7.8}$ TCID₅₀/ml. Entre 3 - 7 día post-desafío (DPD) se observaron erosiones orales en los animales del Grupo A y desde 4 - 14 DPD epifora, secreción nasal mucosa y diarrea. El número de leucocitos (Le) previo al desafío fue de 8,775 Le/ml (± 603) en el Grupo A y de 9,975 Le/ml ($\pm 1,308$) en el Grupo B. Luego del desafío se observó leucopenia en ambos grupos, con un número mínimo de 5875 Le/ml (± 311) en el Grupo A al 6 DPD ($P < 0,05$). En el Grupo A y B se observaron diferencias ($P < 0,05$) respecto al control en el promedio de Le totales durante los 17 DPD. También hubo diferencias ($P < 0,05$) en el número de linfocitos circulantes entre los Grupos desafiados y el control durante los 6 y 7 DPD. En 3 animales del Grupo A se aisló el VDVB de hisopados oculares el 13 y 17 DPD y de Le circulantes el 9 DPD y 11 DPD. El título de anticuerpos neutralizante contra ambos genotipos de VDVB fue más elevado ($P < 0,05$) en los animales del Grupo A. Al momento del desafío éstos tenían un título neutralizante de 1:215 (media geométrica) y 1:128 contra VDVB-1 y -II, respectivamente, elevándose a 1:2048 para ambos genotipos al 17 DPD. Los animales del Grupo B tenían un título de anticuerpos neutralizantes a VDVB-1 de 1:16 previo al desafío, incrementándose a 1:64 al 17 DPD; para el caso de VDVB-2, el título neutralizante de 1:16 al 0 DPD aumentó a 1:181 al 17 DPD. Estos resultados permiten concluir que el nivel de anticuerpos generados por una infección o vacunación con VDVB-1, aumentan para el VDVB genotipo 1 y 2 después de una infección con VDVB-2. Adicionalmente, la infección con VDVB-2 produce leucopenia en animales previamente infectados o vacunados con VDVB-1.

AGRADECIMIENTO

Los autores reconocen la colaboración brindada por la Sra. María A. Poso, y los veterinarios participantes en el Programa de Residencia en Salud Animal de la Unidad Integrada Balcarce, Argentina, en la realización de este trabajo. Se agradece a la Asociación Cooperadora de la EEA Balcarce por la provisión de los animales para experimentación y al Dr. Rubén O. Donis por su aporte en la corrección del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- BOLIN, S. R., S. F. RIDPATH. 1990. Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhea virus vaccines. *Am. J. Vet. Res.* 51: 703-707.
- BOLIN, S. R., E. T. LITTELDIKE, J. F. RIDPATH. 1991. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine diarrhea viruses in a vaccinated herd. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1033-1037.
- BROES A, G. WELLEMANS, J. DHEENDENE. 1992. Syndrome hémorragique chez des bovins infectés par le virus de la diarrhée virale bovine. *Ann. Méd. Vét.* 137: 33-38.
- CARMAN, S., T. VAN DREUMEL, J. RIDPATH, M. HAZLETT, D. ALVES, E. DUBOVI, R. TREMBLAY, S. BOLIN, A. GODKIN, N. ANDERSON. 1998. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 27-35.
- CAY, B., G. CHAPPUIS, C. COULIBALY, Z. DINTER, S. EDWARDS, I. GREISER- WILKE, M. GUNN, P. HAVE, G. HESS, N. JUNTT. 1989. Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 20: 123-129.
- COHEN, J. J., R.C. DUKE. 1984. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* 132: 38.
- CORTESE, V. S., K. H. WETS, L. E. HASSARD, S. CARMAN, J. A. ELLIS. 1998a Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 213: 1312-1319.

- DAVID, G. P., T. R. CRAWSHAW, R. F. GUNNING, R. C. HIBBERD, G. M. LLOYD, P. R. MARSH. 1994. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet. Rec.* 134: 468-472.
- DUBOVI, E. J. 1992. Genetic diversity and BVD virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 15: 155-162.
- MARTIN, S., P. BERLINSKI, P. GUIMOND. 1994. Evaluation of various BVDV isolates to induce protection against challenge with virulent BVDV 890, En: 75 Ann. Meet. Conf. Res. Workers An. Dis. Chicago, EE.UU., p. 183.
- ODEÓN, A. C., G. G. KAISER, R. O. DONIS, G. RISATTI, M. R. LEUNDA. 1998. Aislamiento y análisis molecular del virus de la Diarrea Viral Bovina genotipo II en Argentina, En: XII Reunión Asoc. Arg. Vet. Lab. Diag. Mar del Plata, Argentina, p. 94.
- ODEÓN, A. C., C. L. KELLING, D. J. MARSHALL, E. S. ESTELA, E. J. DUBOVI, R. O. DONIS. 1999. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhea virus genotype II (NY-93). *J. Vet. Diag. Inv.* 11: 221-228.
- PELLERIN, C., J. VAN DER HURK, J. LECOMTE, P. TIJSSEN. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203: 260-268.
- REBHUN, W.C., T.W. FRENCH, J.A. PERDRIZET, E.J. DUBOVI, S.G. DILL, L.F. KARCHER. 1989. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 3: 42-46.
- SCHALM, O. W. 1965. Veterinary Hematology. 2nd ed. Lea & Febiger, Philadelphia.

Aceptado: 19.06.2001