

Desarrollo de la Prueba ELISA para el Diagnóstico del Virus de la Diarrea Viral Bovina

Sipaúba Tavares¹, Rodrigues Almeida², Cristine Helena³

¹Facultad de Ciencia Animal, Universidad de Sonora, México

²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México

³Facultad de Ciencias Clínicas, Universidad Iberoamericana, México

Resumen: La diarrea viral (BVD) es una enfermedad viral aguda y altamente contagiosa de rumiantes caracterizada por fiebre transitoria, diarrea, inmunosupresión, problemas de fertilidad, trombocitopenia, lesiones de la mucosa, aborto, muerte neonatal, malformaciones congénitas, infección persistente de la descendencia, pododermatitis y glomerulonefritis recientemente informada.

Palabras clave: Virus de la Diarrea Viral Bovina, ELISA, Tratamiento, Diagnóstico

1. Introducción

La diarrea viral bovina (BVD) es una enfermedad viral aguda y altamente contagiosa de rumiantes caracterizada por fiebre transitoria, diarrea, inmunosupresión, problemas de fertilidad, trombocitopenia, lesiones de la mucosa, aborto, muerte neonatal, malformaciones congénitas, infección persistente de la descendencia, pododermatitis y glomerulonefritis recientemente[1].

El agente causante de la BVD, el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), pertenece al género Pestivirus en la familia Flaviviridae. Hay dos genotipos de BVDV, BVDV tipo – 1 y BVDV tipo – 2. En el cultivo celular, los pestivirus aparecen como dos biotipos, conocidos como citopáticos (cp) y no citopáticos (ncp). Los biotipos ncp son de naturaleza predominante y a menudo son responsables de la mayoría de los síndromes de la enfermedad[2].

Se han realizado muy pocos estudios para determinar las propiedades fisicoquímicas y no se han realizado estudios con ningún aislado indio. Las propiedades fisicoquímicas y las características de replicación son muy importantes para proporcionar intervenciones adecuadas para el control de la infección. Sin embargo, el conocimiento sobre el efecto de varias preparaciones y desinfectantes a base de alcohol en el BVDV es muy limitado. Por lo tanto, este estudio fue diseñado para determinar las utilidades prácticas de diferentes reactivos y métodos de descontaminación durante el manejo de BVDV en el laboratorio[3].

2. Material y métodos

El estudio se realizó en el Laboratorio de Enfermedades Animales de Alta Seguridad (HSADL), IVRI, Bhopal y el Departamento de Microbiología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias y Ganadería, Mhow, Madhya Pradesh, India[4].

El aislado de BVDV (Ind S – 17555), inicialmente aislado de una oveja y disponible en HSADL, IVRI, Bhopal, se usó en este estudio para investigar las propiedades fisicoquímicas del BVDV.

En este estudio se utilizó la línea celular Oveja Timo Femenino Riems (SFTR) obtenida de Riems, Alemania y disponible en HSADL, IVRI, Bhopal. Las células se cultivaron en medio EMEM que contenía un 10% de suero de caballo y estaban libres de cualquier contaminación accidental de pestivirus[5].

Se usaron conjugado anti-ratón IgG-peroxidasa, criado en conejos (Sigma, n° de cat. A-9044) y conjugado anti-bovino IgG (molécula completa) peroxidasa, criado en conejos (Sigma, cat. No. A-7414) en el ensayo de monocapa de inmunoperoxidasa (IPMA)[6].

En este estudio, se utilizó la dilución 16106 TCID₅₀ de BVDV para determinar el efecto de la temperatura sobre su viabilidad. Se trató un ml de suspensión de virus en EMEM a 56 ° C durante 30, 45 y 60 min, respectivamente, en baño de agua circulante. Luego, la monocapa preformada de células SFTR en una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos se infectó con 300 µl de los inóculos tratados[7]. La placa se incubó a 37 ° C durante 1 h para la adsorción del virus. Se eliminó el inóculo, se enjuagó la monocapa lentamente con 500 µl de

EMEM y se añadieron a los pocillos 2 ml de EMEM suplementado con suero de caballo al 2% (medio de infección). La placa se incubó a 37 ° C en una incubadora de CO₂ durante tres o cuatro días[8].

Después de completar el período de incubación de tres a cuatro días, la placa fue probada por IPMA para detectar virus vivos / sobrevivientes según el método descrito por Wood con ciertas modificaciones. El medio se retiró y la placa se enjuagó con 1X PBS. Las células se fijaron con calor manteniendo la placa a 80 ° C durante 1 hora en un horno de aire caliente y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos[9]. Las células se rehidrataron agregando 300 µl de PBS (1X). Luego se añadieron 50 µl de Mab WB112 diluido 1: 120 (específico para la región NS3) a cada pocillo y se incubaron a 4 ° C. Después de la incubación durante la noche, los pocillos se lavaron tres veces (cada uno de 5 minutos de duración) con 1x PBST (Tween-20 al 0,05%). Luego se añadieron 50 µl de anticuerpos anti-ratón conjugados con HRPO (Sigma), diluidos a 1: 300, a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a 37 ° C. Nuevamente se administraron cuatro lavados con 1X PBST (Tween – 20 al 0,05%). La mezcla de cromógeno original se preparó disolviendo 100 mg de AEC (3 amino-9-etilcarbazol) en 15 ml de DMF (N'N " dimetilformamida)[10]. A partir de este stock, se preparó el sustrato de cromógeno de trabajo AEC añadiendo 300 µl de cromógeno stock en 5 ml de tampón de acetato (pH 4) y 5 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se dispensaron 50 µl de este sustrato de cromógeno de trabajo en cada pocillo y la placa se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Enjuagar la placa con agua corriente del grifo detuvo la reacción. El desarrollo del color rojo en el citoplasma celular se consideró positivo para la infectividad / presencia del virus BVD, mientras que ningún color en el citoplasma celular se consideró negativo para la infectividad o ausencia de virus BVD como se muestra [11].

M) de colorante en tubos eppendorf de 1,5 ml mediante la adición de 1, 5, 10 µl de cada colorante (de la solución madre 1 mM) en el tubo correspondiente y el volumen final se realizó hasta 1000 µl mediante la adición de El virus diluido. El material se mantuvo bajo luz artificial (100 lux) a temperatura ambiente durante 1 hora[12]. La monocapa preformada de células SFTR (3 × 10⁵ células / ml) en una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos se infectó con 300 µl de los inóculos tratados y el procedimiento restante fue el mismo que se describió anteriormente.µ106 TCID₅₀ para cristal violeta) en EMEM. Se prepararon diferentes concentraciones (1, 5 y 10×10⁴ TCID₅₀ para azul de metilo y 1×M de colorantes de azul de metilo y violeta cristal en BVDV en presencia y ausencia de materia orgánica (leche en polvo). El BVDV se diluyó (1µSe estudió el efecto de las concentraciones 1, 5 y 10[13].

Para estudiar el efecto de los colorantes sobre BVDV en presencia de leche en polvo, el virus se diluyó en EMEM suplementado con leche en polvo al 1% y todos los demás procedimientos seguidos fueron los mismos que se describieron anteriormente[14].

Para estudiar el efecto de los alcohols, el tratamiento se administro como 8 partes de alcohol + 1 parte de virus (1*10⁴ TCID₅₀ de BVDV) + 1 parte de medio.

por triplicado y se mezclaron adecuadamente. Los tubos se incubaron a 20 ° C en un baño de agua circulante durante 15, 30 y 60 segundos, respectivamente, y luego se agregaron 900 µl de EMEM enfriados con hielo en cada tubo[15]. Posteriormente, la monocapa preformada de células SFTR en placas de cultivo celular de seis pocillos se infectó usando 300 µl de inóculo y el procedimiento restante fue el mismo que se describió anteriormente.×Para estudiar el efecto del 70% de etanol, se dispensaron 80 µl de etanol al 87.5%, 10 µl de virus diluido (1 T104 TCID₅₀) y 10 µl de EMEM por triplicado y se mezclaron adecuadamente en un tubo eppendorf, mientras que para 80% de etanol 80 µl de Se mezcló etanol al 100% con volúmenes idénticos de virus diluido y EMEM. Para etanol al 95%, se dispensaron 90 µl de etanol al 100% y 10 µl de virus diluido (1*10⁴ TCID₅₀)[16].

en EMEM en cada tubo eppendorf de 2 ml y luego el pH del medio se ajustó a 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 y 7 con glacial ácido acético. Luego se mantuvo el material durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se ajustó el pH del inóculo a 7 usando NaOH 0,1M. La monocapa preformada de células SFTR en placas de seis pocillos se infectó con 300 µl de inóculos tratados y luego se siguió el procedimiento restante igual al descrito anteriormente.×Se tomó un ml de virus diluido (1 *10⁶ TCID₅₀)[17].

DTT es un agente reductor de enlaces disulfuro. Se dispensaron 450 µl de virus diluido (1 × 10⁶ TCID₅₀) en EMEM y 50 µl de DTT (stock 100 mM) en siete tubos eppendorf de 2 ml para hacer la concentración final de DTT 10 mM en cada tubo. El pH del medio se ajustó a 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 y 7 con HCl y se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de completar el período de incubación, el pH de los inóculos se ajustó a 7 usando NaOH 0,1M. La monocapa preformada de células SFTR en placas de seis pocillos se infectó con 300 µl de inóculos tratados y luego se siguió el procedimiento restante como se describió anteriormente.

y se incubaron a 37 ° C durante 1 h para la adsorción del virus. Luego se añadieron 1,5 ml de EMEM que contenía la cantidad respectiva de concentración de cloruro de amonio con suero de caballo al 2% en los pocillos respectivos. La placa se incubó a 37 ° C en una incubadora con CO₂ al 5% durante 3 días y se siguió el procedimiento de reposo como se describió anteriormente. La titulación del virus del lisado celular se realizó por IPMA según el procedimiento de Wood et al. (2004)×Se prepararon diferentes concentraciones de cloruro de amonio: 1, 2, 3, 4, 5, 6.5, 7.5, 8.5 y 10 mM en tubos eppendorf de 2 ml al agregar 40, 80, 120, 160, 200 µl, 260, 300, 340 y 400 µl de solución de cloruro de amonio, respectivamente de 50 mM de stock y el volumen final se realizó hasta 2000 µl mediante la adición de EMEM. La monocapa preformada de células SFTR en placas de cultivo de tejidos de seis pocillos se inoculó con 500 µl de concentración respectiva de cloruro de amonio y se mantuvo a 37 ° C durante 15 min. El medio se retiró de los pocillos, las células se infectaron con 300 µl de virus diluido (1*10⁴ TCID₅₀).

El pH obtenido fue de 8, 9 y 12 para 0.25, 0.5 y 1.0 por ciento de NaOH, respectivamente, y superior a 14 para otras concentraciones. Los inóculos tratados se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 hora y luego el pH del inóculo se ajustó a 7 usando HCl 0,1 M. La monocapa de la célula SFTR en una placa de cultivo de tejido de 6 pocillos se infectó con 300 µl de inóculo del material tratado y el procedimiento restante seguido fue el mismo que se describió anteriormente.×Se prepararon diferentes concentraciones de hidróxido de sodio: 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 por ciento agregando 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5, 75, 87.5 y 100µl de NaOH (del stock NaOH 10 M), respectivamente, y el volumen final se realizó hasta 1000 µl mediante la adición del virus diluido (1*10⁶ TCID₅₀).

El inuculo fue incubado a 37oC×Se realizaron diferentes concentraciones de tripsina, como 0.025, 0.05, 0.10, 0.20, 0.25 y 0.3 por ciento al agregar 5, 10, 20, 40, 50 y 60 µl de tripsina (del 5% de stock de tripsina) respectivamente, y se hizo el volumen final. hasta 1000 µl agregando BVDV diluido (1 *10⁴ TCID₅₀).durante 1 h en un baño de agua circulante y luego se añadió suero de caballo para neutralizar la tripsina. La monocapa preformada de células SFTR en una placa de cultivo celular de seis pocillos se infectó usando 300 µl de inóculos del material tratado y el procedimiento restante seguido fue el mismo que se describió anteriormente.

en los tubos respectivos . La monocapa preformada de células SFTR en placas de cultivo celular de seis pocillos se infectó usando 300 µl de inóculo del material tratado y el procedimiento restante seguido fue el mismo que se describió anteriormente.×En el tubo eppendorf de 1,5 ml, se hicieron diferentes concentraciones de cloroformo, tales como 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 y 6 por ciento mediante la adición de 2,5, 5, 10, 15, 20 , 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 µl (del stock de solución de cloroformo al 100%), respectivamente, y el volumen final se realizó hasta 1000 µl mediante la adición de virus diluido (1*10⁶ TCID₅₀).

Efecto de la temperatura Los resultados de la prueba realizada para evaluar el efecto de la temperatura (56oC) sobre la supervivencia del virus indicaron que el BVDV podría inactivarse a 56oC durante 30 minutos (Tabla 1). Esto tiene implicaciones prácticas en que el suero bovino u ovino utilizado para el cultivo celular puede liberarse de contaminaciones adventicias de BVDV con dicho tratamiento.

Después de tratar la suspensión del virus BVDV con colorante azul de metilo / violeta cristal durante 1 hora bajo luz artificial (100lux) a temperatura ambiente, los resultados mostraron que el colorante azul de metilo no tuvo efecto en la inactivación del virus a una concentración de 1 a 10 µM en ausencia o presencia de leche en polvo (materia orgánica) como se muestra en la. Mientras que el colorante violeta cristal no tiene ningún efecto sobre la supervivencia del virus hasta la concentración de 5 µM, ya sea en ausencia o en presencia de leche en polvo al 1%. Sin embargo, el cristal violeta inactivó completamente el virus a una concentración de 10 µM y superior, tanto en presencia como en ausencia de leche en polvo, como se muestra en la. Kevin y col estudiaron el efecto de los colorantes de azul de metilo y violeta de metil fenotiazina e informaron que ambos colorantes inactivaron el BVDV completamente en calostro de cabra a una concentración de 10 y 20 µM después de 60 minutos de iluminación bajo luz artificial. Los resultados se correlacionaron bien para el cristal violeta, pero no para el azul de metilo, que puede deberse a diferentes composiciones de los tintes o diferentes cepas de virus utilizadas en el estudio.

3.Resultados

El etanol a una concentración de 70% o más y el propanol a una concentración de 30% o más inactivaron completamente el BVDV cuando se expusieron durante al menos 15 segundos a 20 ° C. En un estudio, Gunter observaron que los desinfectantes para manos a base de alcohol (etanol y propanol) redujeron la infección del virus BVD en > 4log₁₀ pasos en 15 segundos independientemente de la carga orgánica.

Nuestros resultados corroboraron estos resultados y también mostraron que se puede asegurar que el 70% de etanol y el 30% de propanol sean activos contra virus envueltos clínicamente relevantes. En el estudio anterior, se usó una concentración de etanol del 75% o más, mientras que nuestro estudio incluyó etanol al 70%, que es un desinfectante de manos común utilizado en muchos laboratorios. No pudimos evaluar el tiempo de exposición inferior a 15 segundos, pero solo tiene una relevancia clínica limitada.

El tratamiento de la suspensión de virus a pH ácido (pH – 3 a pH – 7) durante 1 hora a temperatura ambiente mostró que el virus BVD estaba completamente inactivado a pH ácido – 3 y menos, mientras que era viable a pH – 3.5 y superior (Tabla 4) Mientras que el efecto inhibitorio de la DTT (10 mM) a varios niveles de pH mostró que BVDV estaba completamente inactivado a un pH de 4.5 e inferior solamente.

Esto demostró que la inactivación de BVDV puede tener lugar en presencia de pH ácido y agente reductor de enlaces disulfuro DTT. La capacidad de supervivencia a pH 3.5 y superior respalda la evidencia anterior de una notable resistencia a los ácidos de los pestivirus como BVDV y CSFV a diferencia de los alfavirus y flavivirus de la familia Flaviviridae. Esto tiene consecuencias más prácticas, ya que el BVDV puede permanecer vivo en la carne y los productos cárnicos de P.I. animales en ambientes bastante ácidos y pueden transmitirse a animales susceptibles. Una característica única del BVDV es la presencia de homodímeros unidos de manera covalente (Erns – Erns, E2 – E2) y heterodímeros (Erns – E2 y E1 – E2), que pueden contribuir a la resistencia del virus a los ácidos. La desactivación de BVDV solo se observó cuando se trató con el agente reductor DTT a pH bajo. La inactivación podría deberse a la reducción de los enlaces disulfuro en las glucoproteínas por la TDT. El mecanismo por el cual ocurre, sin embargo, queda por dilucidar en futuros estudios.

Como se muestra, se encontró que el virus BVD estaba completamente inactivado a una concentración de 10 y 15 mM de cloruro de amonio, mientras que el título del virus se redujo significativamente a concentraciones de 7.5 y 8.5 mM, y no hubo ningún efecto hasta la concentración de 3 mM.

El efecto de los inhibidores químicos de la endocitosis, como el cloruro de amonio en la internalización del BVDV, se ha estudiado anteriormente, lo que sugiere que el BVDV invade la célula huésped a través de la endocitosis dependiente de clatrina mediada por el receptor. El cloruro de amonio es una base débil lisosomotrópica, que neutraliza reversiblemente la acidificación en el endosoma y, por lo tanto, puede bloquear completamente la infección por BVDV de las células susceptibles. El cloruro de amonio a una concentración de 5 mM disminuyó, hasta 6 veces, la penetración viral en las células MDBK tratadas. Nuestro estudio también mostró resultados casi similares, en donde se notó una disminución de 10 veces en las penetraciones virales a una concentración de cloruro de amonio de 5 mM. Mientras que la penetración del virus BVD en las células SFTR tratadas se inhibió por completo a una concentración de cloruro de amonio de 10 mM y superior (Tabla 7), que es un avance importante del conocimiento sobre la adsorción y penetración de BVDV.

Como se muestra en la Tabla 8, después de tratar la suspensión del virus a diferentes concentraciones de NaOH durante 1 hora y después de probar el lisado celular resultante por IPMA, se descubrió que el NaOH era ineficaz a una concentración de 0.25 y 0.50 por ciento (pH – 8 y pH – 9) , mientras inactivó completamente el virus a una concentración de 1% y superior (pH 12) expuesto durante 1 hora a temperatura ambiente. También se informa que el NaOH a concentraciones de 0.1M inactiva el virus BVD a un nivel indetectable a 60°C en 15s. Como la solución de NaOH se usa ampliamente para descontaminar desechos biológicos y de laboratorio, la solución al 1% puede ser utilizado para inactivar virus envueltos como BVDV, Hepatitis – C y virus Dengue.

4. Conclusión

La tripsina inactivó el virus a un nivel indetectable a una concentración de 0.05% y superior cuando se expuso durante 1 hora a 37 ° C, mientras que no se observó inactivación con 0.025% de tripsina. Sin embargo, el cloroformo inactivó completamente el virus BVD a una concentración del 5% y superior después de 1 hora de exposición a temperatura ambiente. Esto sugiere que la tripsina y el cloroformo podrían ser efectivos agentes virucidas contra los pestivirus.

El estudio de las propiedades fisicoquímicas del BVDV reveló que los pestivirus son inactivados por diversos agentes físicos y químicos, como la temperatura a 56 ° C durante 30 minutos, NaOH al 1% durante 1 hora, la tripsina al 0.05% durante 1 hora, el cloroformo al 5% durante 1 hora; Etanol al 70% en 15 segundos; Propanol 30% en 15 segundos, Cristal violeta 10 µM durante 60 minutos, cloruro de amonio durante 15 minutos de exposición, respectivamente y pH 3 y menos después de 1 hora de exposición. El propanol (30%) puede usarse como un sustituto efectivo del etanol (70%) como desinfectante de manos en el laboratorio, cuando este último no está disponible debido a restricciones legales.

Referencias

- [1] Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M.I., Ferreira De Souza, F. "Cryopreservation of bovine spermatozoa from the epididymal tail using conventional and automated methods", (2014) Archivos de Medicina Veterinaria, 46 (1), pp. 31-38.
- [2] Hars, J., Richomme, C., Riviere, J., Payne, A., Faure, E., Boschirol, M.L. "Bovine tuberculosis in wildlife in France. Risk for cattle", (2013) Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, 166 (3), pp. 222-229.
- [3] Serna, L., Enríquez, C.E., Gaona, R.C., Vásquez, A. "Cellular response of the bovine mammary gland after *Weissella confusa* infusion to control *Streptococcus agalactiae*", (2013) Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 26 (4), pp. 280-287.
- [4] Carmona-Gasca, C.A., Lara, L.L., Castillo-Sánchez, L.O., Ramírez-Ortega, J.M., Ko, A., Palomera, C.L., de la Peña-Moctezuma, A. "Detection of *Leptospira santarosai* and *L. kirschneri* in cattle: New isolates with potential impact in bovine production and public health", (2011) Veterinaria Mexico, 42 (4), pp. 277-288.
- [5] Zschöck, M., El-Sayed, A., Eissa, N., Lämmler, C., Castañeda-Vázquez, H. "Penicillin G and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis", (2011) Veterinaria Mexico, 42 (3), pp. 207-217.
- [6] Capurro, E. "Alerts to consider to protect the healthy rooms of the bovine udder", (2017) Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 30, pp. 200-202.
- [7] Villar, D., Duque, L., Giraldo, C., Montes, J.E.P., Pallares, F., Schwartz, K. "Posterior paralysis in a Holstein cow with enzootic bovine leukosis", (2012) Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 25 (2), pp. 325-329.
- [8] Rincón, J.C., López, A., Echeverri, J. "Genetic variability of the bovine prolactin-Rs1 loci in Holstein cattle in Antioquia province (Colombia)", (2012) Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 25 (2), pp. 191-201.
- [9] Covarrubias, A.G.M., Flores, M.A.S., Ruiz, C.C.G., Humara, L.C.F., López, D.C., Díaz Aparicio, E., Andrade, L.H., Ochoa, M.A.B. "Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis", (2012) Técnica Pecuaria en México, 3 (1), pp. 1-18.
- [10] López-Vázquez, M., Martínez-Castañeda, J.S., Talavera-Rojas, M., Valdez-Alarcón, J.J., Velázquez-Ordóñez, V. "Detection of *mecA*, *mecI* and *mecR1* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of bovine origin isolated from Family Dairy Farms, Mexico", (2015) Archivos de Medicina Veterinaria, 47 (2), pp. 245-249.
- [11] Campos, F.L., Valente, P., Ethur, E.M., Avancini, C.A.M. "Disinfectant activity of the crude hydroalcoholic extract of *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) on *Candida* spp. isolated in problem-situations of bovine mastitis", (2016) Acta Veterinaria Brasilica, 10 (4), pp. 327-333.
- [12] Carrisoza Urbina, J., Flores Velázquez, E., Gutiérrez Reyes, J.A., Juárez López, N.O. "Assessment of the degree of concordance between the results of histopathological examination and bacterial culture in the diagnosis of bovine tuberculosis in Mexico", (2015) Veterinaria Mexico, 2 (3), 12 p.
- [13] López, C., Giraldo, C.E., Carmona, J.U. "Evaluation of a double centrifugation tube method for concentrating bovine platelets: Cellular study", (2012) Archivos de Medicina Veterinaria, 44 (2), pp. 109-115.
- [14] Muñoz-Bañales, L.A., Sánchez-Ramírez, B., González-Rodríguez, E., Moreno-Brito, V., González-Horta, C., Burrola-Barraza, M.E. "Two new miRNAs identified in bovine ovary", (2014) Archivos de Medicina Veterinaria, 46 (2), pp. 181-188.
- [15] Romero, R.R., Martínez, B.C., Mayagoitia, A.L., Rodríguez Tovar, L.E., Nevárez Garza, A.M. "Presence of bovine virus diarrhoea in association with other pathologies in feedlot cattle", (2012) Veterinaria Mexico, 43 (3), pp. 225-234.
- [16] Romero, R.R., Báez, A.G., Garza, A.M.N., Tovar, L.E.R. "Report of three cases of bovine paralytic rabies and babesiosis in Aldama, Tamaulipas", (2011) Veterinaria Mexico, 42 (4), pp. 331-338.
- [17] Camacho, C.P.C., Mármol, L.E., Borda, E.F.C., Medina, S.J.M., Gutiérrez, F.A.A. "Detection of seven viruses and *Mycoplasma* in fetal bovine serum by real time PCR", (2011) Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 24 (4), pp. 585-597.

Development of ELISA Test for the Diagnosis of Bovine Viral Diarrhoea Virus

Abstract: Viral Diarrhoea (BVD) is an acute, highly contagious viral disease of ruminants characterized by transient fever, diarrhoea, immunosuppression, fertility problems, thrombocytopenia, mucosal lesions, abortion, neonatal death, congenital malformations, persistent infection of the offspring, pododermatitis and recently reported glomerulonephritis.

Keywords: Bovine Viral Diarrhoea Virus, ELISA, Treatment, Diagnosis