



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**"DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASA EN AISLADOS
CHILENOS DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA"**

NATALIA ANDREA DEVIA ULLOA

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: JOSÉ PIZARRO LUCERO

Financiamiento: Proyecto FONDECYT #1060581

SANTIAGO, CHILE

2014



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**"DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASA EN AISLADOS
CHILENOS DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA"**

NATALIA ANDREA DEVIA ULLOA

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina Preventiva Animal

Financiamiento: Proyecto FONDECYT #1060581

Nota Final

	Nota	Firma
Profesor Guía: José Pizarro L.
Profesor Consejero: María Orfelía Celedón V.
Profesor Consejero: Marco Galleguillos C.

SANTIAGO, CHILE

2014

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Quiero agradecer a quienes me apoyaron en este proceso:

En primer lugar al Dr. José Pizarro, por recibirme en el Laboratorio de Virología y por su paciencia y buena disposición al enseñarme y explicarme.

A la Dra. María Orfelía Celedón por el cariño y la voluntad para resolver mis dudas.

A Francisca Núñez por estar siempre dispuesta a ayudarme, especialmente, cuando necesitaba células, a mis compañeros memoristas por enseñarme cuando lo necesitaba y a la Sra. Elcira Valenzuela por su cariño y simpatía y por los buenos momentos que pasamos en el laboratorio.

Al Dr. Marco Galleguillos y al Dr. Héctor Adarmes por facilitarme el espectrofotómetro del Laboratorio de Bioquímica y por su paciencia infinita al enseñarme a utilizarlo.

Al Dr. Luis Ibarra por su buena disposición al asistirme con los análisis estadísticos que debí realizar.

A la Sra. Patricia Álvarez por su ayuda y simpatía.

Y por último, quiero agradecer a mi familia y amigos por brindarme su apoyo incondicional, su cariño y consejos en todo momento.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

ÍNDICE DE CAPÍTULOS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. INFECCIÓN HORIZONTAL	3
2. INFECCIÓN VERTICAL.....	5
3. VIRUS	8
4. VIRULENCIA	12
5. GLICOPROTEÍNA E ^{ms}	13
6. SITUACIÓN EN CHILE.....	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	17
1. OBJETIVO GENERAL.....	17
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
1. AISLADOS VIRALES.....	18
2. CULTIVOS Y SUBCULTIVOS CELULARES	19
3. AMPLIFICACIÓN VIRAL EN MONOCAPAS DE CÉLULAS MDBK.....	19
4. TITULACIÓN VIRAL POR INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA	20
5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASA DEL VDVB.....	21
5.1. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO VIRAL EN LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD RIBONUCLEASA	22
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXOS	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Aislados nacionales del VDVB según año y lugar de aislamiento y cuadro clínico asociado.....	18
Tabla 2: Actividad RNasa de aislados nacionales de los subgenotipos 1b y 1j y cepa NADL del VDVB	24
Tabla 3: Título viral de las distintas cepas del VDVB.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de la glicoproteína E ^{rns} en su forma dimérica	14
Figura 2: Promedios de actividad RNasa de las distintas cepas del VDVB	25

RESUMEN

El Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un patógeno de gran importancia, puesto que es responsable de importantes pérdidas económicas en la industria del bovino, debido a que causa disminución en la producción, trastornos reproductivos y, en algunos casos, puede provocar la muerte del animal.

El VDVB pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. Es un virus cuyo genoma es un ARN de hebra simple y polaridad positiva, que presenta dos regiones no codificantes en sus extremos (5'NCR y 3'NCR) y una única región codificante entre ambas, la cual codifica para una poliproteína que contiene todas las proteínas virales. Una de estas proteínas es la glicoproteína E^{ms}, que posee actividad RNasa. Esta actividad enzimática no es necesaria para la multiplicación del virus y se reconoce como un factor de virulencia, dado que su inhibición produce atenuación de los signos clínicos en el hospedero.

En la presente memoria se midió la actividad RNasa de cuatro aislados nacionales del VDVB, pertenecientes a los subgenotipos 1b (CH/113 y CH/1025) y 1j (CH/511 y CH/1087), los subgenotipos más predominantes en el país; y la cepa de referencia internacional, NADL, perteneciente al subgenotipo 1a. Ambos virus del subgenotipo 1j presentan una mutación en el sitio activo de la actividad RNasa de la glicoproteína E^{ms}, correspondiente a la sustitución del aminoácido Histidina por Tirosina, mientras que los otros virus estudiados poseen la secuencia silvestre del VDVB.

Los resultados obtenidos muestran que los virus del subgenotipo 1j presentan una baja ostensible de su actividad RNasa. Por el contrario, las cepas del subgenotipo 1b presentan niveles de actividad RNasa comparables a los de la cepa de referencia NADL. Al comparar las diferencias en actividad enzimática entre las cepas que presentaron o no la mutación, utilizando el método de Scheffé, se determinó que estas diferencias son estadísticamente significativas.

Estos resultados sugieren que la sustitución de Histidina por Tirosina en la posición 79 de la glicoproteína E^{ms}, sería responsable de la disminución de la actividad RNasa del VDVB, con un potencial impacto en la disminución de la virulencia de los virus del subgenotipo 1j.

ABSTRACT

Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) is a pathogen of great importance, since it is responsible for important economic losses in the cattle industry, because it causes decreased production, reproductive disorders and in some cases it can provoke the death of the animal.

BVDV belongs to the genus *Pestivirus* within the family *Flaviviridae*. It's a virus which genome corresponds to a single-stranded RNA of positive polarity, that presents two non-coding regions at its ends (5' NCR and 3' NCR) and a unique coding region between them, which codes for a poliprotein that contains all the viral proteins. One of these proteins is the E^{ms} glycoprotein, which possesses RNase activity. This enzymatic activity is not required for virus replication and is recognized as a virulence factor because its inhibition results in attenuation of the clinical signs in the host.

In the present thesis RNase activity from four BVDV national isolates was measured, belonging to the 1b (CH/113 and CH/1025) and 1j (CH/511 and CH/1087) subgenotypes, the most prevalent subgenotypes in the country; and the international reference strain, NADL, which belongs to the 1a subgenotype. Both viruses from the 1j subgenotype present a mutation at the active site for the RNase activity of the E^{ms} glycoprotein, corresponding to the substitution of the amino acid Histidine for Tyrosine, whereas the other viruses in study possess the wild BVDV sequence.

The obtained results show that the viruses from the 1j subgenotype present an ostensible drop in their RNase activity. On the contrary, strains from 1b subgenotype

present levels of RNase activity comparable to those from the reference strain NADL. By comparing the differences in enzymatic activity between the strains with or without the mutation, using Scheffe's method, it was determined that these differences were statistically significant.

These results suggest that the substitution of Histidine for Tyrosine in position 79 of the E^{ms} glycoprotein would be responsible for the decrease in the RNase activity of BVDV, with a potential impact in the decrease of the virulence of the viruses within the 1j subgenotype.

INTRODUCCIÓN

El Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un virus de difícil control, debido a su distribución mundial, la gran cantidad de especies animales que infecta y la gran variedad de cuadros clínicos que provoca, los cuales van desde una infección subclínica, hasta una infección clínica con signos fulminantes que llevan rápidamente a la muerte del animal.

El VDVB afecta principalmente al ganado bovino, sin embargo, también ha sido aislado de otras especies, como ovinos, caprinos, porcinos, camélidos sudamericanos y rumiantes silvestres.

El virus puede transmitirse de manera vertical u horizontal. La transmisión horizontal ocurre principalmente por el contacto directo entre animales infectados y susceptibles y puede manifestarse de manera subclínica o de alguna de las formas clínicas descritas, que son enfermedad aguda, enfermedad aguda severa, enfermedad hemorrágica, enfermedad respiratoria y enfermedad aguda con inmunodepresión.

La transmisión vertical ocurre cuando el animal infectado se encuentra gestante y el virus atraviesa la placenta e infecta al feto. En el caso de la madre, la enfermedad cursa como fue descrito anteriormente, pero en el caso del feto, la infección puede resultar en muerte embrionaria temprana, abortos, defectos congénitos, nacimiento de animales inmunotolerantes o nacimiento de terneros sanos seropositivos al virus. El nacimiento de terneros con infección persistente e inmunotolerantes al virus sólo ocurre si la cepa viral que ocasionó la infección pertenece al biotipo no citopático (NCP). Los animales inmunotolerantes pueden cursar con una forma letal de la enfermedad, denominada enfermedad de las mucosas al infectarse con una cepa viral del biotipo citopático (CP) homóloga antigénicamente a la cepa que causó la infección persistente.

El VDVB es un virus ARN de hebra simple, de polaridad positiva, que pertenece al género *Pestivirus*, de la familia *Flaviviridae*. Este género también incluye al Virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC) y al Virus de la Enfermedad de la Frontera (VEF).

Existen dos genotipos del virus, el VDVB genotipo 1 (VDVB1) y el VDVB genotipo 2 (VDVB2) y a la fecha se describen 16 subgenotipos para el VDVB1 (1a a 1p) y 2 subgenotipos para el VDVB2 (2a y 2b). Adicionalmente las cepas virales pueden pertenecer a un biotipo CP o NCP, según su efecto en cultivos celulares.

El VDVB posee una envoltura lipídica en la cual se encuentran presentes tres glicoproteínas virales, E^{ms}, E1 y E2. La glicoproteína E^{ms}, que además es secretada al medio extracelular, posee actividad ribonucleasa (RNasa) y se ha demostrado que esta actividad enzimática es un determinante de virulencia del virus.

En Chile, el virus se aisló por primera vez desde bovinos naturalmente infectados en la década del '80. Estudios posteriores dan cuenta de una amplia diseminación del virus en el país, con una prevalencia serológica de un 69,2% en las regiones IX y X del país y de un 59,7% y 86% en bovinos de leche y de carne de la Región Metropolitana, respectivamente. Estudios moleculares indican que en Chile, el VDVB presenta una alta variabilidad genómica, antigénica y biológica, con la presencia de ambos genotipos virales y los subgenotipos 1a, 1b, 1i, 1j y 2a.

En esta Memoria de Título, se midió la actividad RNasa de cuatro aislados nacionales del VDVB, pertenecientes a los subgenotipos 1b (CH/113 y CH/1025) y 1j (CH/511 y CH/1087), los subgenotipos más predominantes en el país; y la cepa de referencia internacional, NADL, perteneciente al subgenotipo 1a. Ambos virus del subgenotipo 1j presentan una mutación en el sitio activo de la actividad RNasa de la glicoproteína E^{ms}, correspondiente a la sustitución del aminoácido Histidina por Tirosina, mientras que los otros virus estudiados poseen la secuencia silvestre del VDVB.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El Virus Diarrea Viral Bovina es un patógeno de importancia económica y distribución mundial (Baker, 1987). Este virus infecta a un amplio rango de hospederos, que incluye a bovinos, caprinos, ovinos, porcinos, camélidos sudamericanos y una amplia diversidad de rumiantes silvestres, con una transmisión interespecie que favorecería la diseminación del virus (Evermann y Barrington, 2005).

La principal vía de infección del VDVB es a través de la mucosa nasal, siendo la ruta más efectiva de transmisión el contacto directo entre animales infectados y susceptibles. También se describe transmisión indirecta por uso de instrumental contaminado y el alojamiento de animales sanos en instalaciones utilizadas recientemente por animales infectados. El virus se multiplica en los nódulos linfáticos y se disemina sistémicamente por medio de células linfoides presentes en la sangre. En animales con infecciones secundarias la recuperación puede prolongarse, dependiendo de la severidad de éstas.

La infección con el VDVB genera variadas manifestaciones clínicas, lo que depende de factores tanto del hospedero como del agente. La mayoría de las infecciones por VDVB en animales seronegativos e inmunocompetentes cursan de manera subclínica con presencia de fiebre leve, leucopenia, desarrollo de anticuerpos seroneutralizantes y, en ganado lechero, disminución de la producción láctea. Ya sea que la infección por VDVB sea de naturaleza aguda o subclínica, hay un período de eliminación del virus, durante el cual, el ganado transitoriamente infectado puede ser una fuente de virus para los rumiantes susceptibles (Evermann y Barrington, 2005).

1. INFECCIÓN HORIZONTAL

La respuesta clínica a la infección es compleja y depende de varios factores del hospedero y del agente. Dentro de los factores del hospedero se describen inmunocompetencia, inmunotolerancia, preñez, edad gestacional del feto, estado inmune

y nivel de estrés medioambiental al que está sometido. Dentro de los factores del virus se consideran diversidad genómica y antigénica dentro de los aislados virales. Del mismo modo la duración de los signos clínicos es variable, y depende de la duración de la viremia, la virulencia del virus infectante, presencia de infecciones secundarias y de la normal capacidad regenerativa de los tejidos afectados (Evermann y Barrington, 2005).

Animales inmunocompetentes infectados por el VDVB, pueden desarrollar cinco formas de presentación clínica: enfermedad aguda, enfermedad aguda severa, enfermedad hemorrágica, enfermedad respiratoria y enfermedad aguda con inmunodepresión (Evermann y Barrington, 2005).

a) Enfermedad aguda: La enfermedad es autolimitante y de corta duración. Los signos clínicos incluyen diversos grados de fiebre, anorexia, letargo, secreción ocular y nasal, erosiones orales y úlceras, diarrea, con disminución de la producción láctea en vacas lactantes (Evermann y Barrington, 2005). En la infección aguda por VDVB se ha observado disminución en el número de linfocitos T y B y neutrófilos (Evermann y Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005).

b) Enfermedad aguda severa: Es una forma atípica y severa. Es de curso hiperagudo, presenta altas tasas de morbilidad y mortalidad en animales de todas las edades. Los animales afectados sufren de fiebre, neumonía, muerte súbita y abortos en vacas preñadas. En un bajo porcentaje de animales afectados, la enfermedad puede progresar hacia un síndrome hemorrágico fulminante cuando el virus disemina a la médula ósea (Evermann y Barrington, 2005). Sin embargo, no todas las cepas de VDVB son capaces de alcanzar la médula ósea. Adicionalmente la reducción de las plaquetas no siempre resulta en hemorragias marcadas (Liebler-Tenorio, 2005).

c) Enfermedad hemorrágica: Es una forma de enfermedad aguda severa que se desarrolla cuando la cepa infectante de VDVB se disemina a la médula ósea, provocando una infección de los megacariocitos, lo cual produce trombocitopenia y, consecuentemente, hemorragias en el animal infectado (Liebler-Tenorio, 2005). Los animales afectados presentan trombocitopenia marcada, petequias y equimosis en

mucosas, epistaxis, hifema, diarrea sanguinolenta, sangrado desde sitios de inyección, fiebre, leucopenia y muerte (Evermann y Barrington, 2005).

d) Enfermedad respiratoria: El VDVB puede causar infecciones en el tracto respiratorio, principalmente mediante un efecto inmunodepresor en el sistema respiratorio. Los signos clínicos evidenciados son fiebre, neumonía y anorexia. Es la primera causa de muerte en ganado de engorda y puede complicarse con infecciones bacterianas secundarias (Evermann y Barrington, 2005).

e) Enfermedad aguda con inmunodepresión: El VDVB destruye el tejido linfoide provocando inmunodepresión, la cual aumenta la susceptibilidad del hospedador a otros patógenos y exagera la patogenicidad de organismos co-infectantes. Los animales afectados presentan disminución en la función leucocitaria, leucopenia, linfopenia y disminución de la función de macrófagos y neutrófilos (Evermann y Barrington, 2005).

2. INFECCIÓN VERTICAL

La infección con el VDVB también provoca problemas reproductivos, tales como reducción en la fertilidad y mortalidad embrionaria temprana, debido a la infección del virus en el sistema reproductivo de la hembra. En vacas gestantes inmunocompetentes, la infección con el VDVB puede cursar de forma subclínica o con alguna de las cinco manifestaciones clínicas descritas anteriormente. Sin embargo, el virus también es capaz de infectar al feto, ya que atraviesa la placenta con alta eficiencia (Liebler-Tenorio, 2005). Sin embargo, la enfermedad en la madre puede no reflejar la severidad de los efectos de la infección en el feto y puede resultar en muerte embrionaria temprana, aborto o infecciones/defectos congénitos (Evermann y Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005). La edad gestacional es el principal determinante del resultado de la infección fetal, aunque también pueden participar otros factores del hospedero o del virus (Liebler-Tenorio, 2005).

a) Infección transplacentaria/intrauterina: La infección viral poco antes de la preñez tiene severas consecuencias en el rendimiento reproductivo, ya que altera el equilibrio

hormonal, lo que reduce la tasa de concepción y tiene efectos directos sobre el embrión. En gestaciones más tardías, el resultado de la infección depende del desarrollo de las células blanco, la fase de la organogénesis y el desarrollo del sistema inmune fetal. Las secuelas también son determinadas por propiedades del virus, especialmente del biotipo del VDVB. El VDVB citopatogénico (CP) parece causar más daño en el embrión que el biotipo no citopatogénico (NCP), pero sólo el biotipo NCP es capaz de generar el nacimiento de animales inmunotolerantes al virus y persistentemente infectados (PI) (Liebler-Tenorio, 2005).

El feto es susceptible a la infección transplacentaria después de los 30 días de gestación, la cual puede resultar en aborto, infección persistente, mortinatos, efectos teratogénicos o el nacimiento de un ternero normal con anticuerpos contra VDVB. El VDVB puede causar abortos, los que ocurren más frecuentemente en las etapas tempranas de gestación, sin embargo, también se han encontrado en la fase tardía. Generalmente la expulsión del feto no ocurre inmediatamente, sino semanas a meses después (Liebler-Tenorio, 2005).

Durante el primer trimestre de gestación (hasta 125 días de gestación), la infección del feto con un VDVB NCP puede resultar en el nacimiento de un animal PI. Esto ocurre porque el feto tiene su sistema inmune inmaduro, por lo que reconoce al virus como un antígeno propio, desarrollando tolerancia a éste y no se monta una respuesta inmune contra la cepa viral que ocasionó la infección intrauterina (Evermann y Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005).

La infección persistente se ha establecido con ambos genotipos del VDVB (VDVB1 y VDVB2). Los animales con inmunotolerancia al VDVB se caracterizan por presentar una amplia distribución virus en todos sus órganos, sin lesiones morfológicas asociadas y sin respuesta inmune contra la cepa persistente del VDVB. La inmunotolerancia es limitada a la cepa de VDVB que causó la infección intrauterina, por lo que una infección con otra cepa de VDVB inducirá una respuesta inmune (Liebler-Tenorio, 2005). Los animales PI liberan virus en gran escala, desde múltiples sitios, permaneciendo virémicos por largos períodos (Schweizer y Peterhans, 2001) y son una fuente importante de infecciones

horizontales y verticales para los animales susceptibles del rebaño. Estos animales tienen un rendimiento reproductivo reducido, sin embargo, también pueden concebir y parir terneros vivos, los cuales siempre son PI. Sólo algunos folículos son positivos al VDVB, pero si los ovocitos no están infectados, la infección del feto ocurrirá durante la gestación temprana, cuando éste se hace susceptible, debido a la presencia continua del virus en la madre gestante (Liebler-Tenorio, 2005).

Cuando la infección por VDVB ocurre entre los 80 y los 150 días de gestación se describen defectos congénitos en el feto. El feto parece ser más susceptible a los efectos teratogénicos del virus cuando comienza a desarrollarse la inmunocompetencia, se establece la habilidad de montar una respuesta inflamatoria y la organogénesis no se ha completado. Se observa retardo del crecimiento intrauterino y maduración reducida de numerosos tejidos (Liebler-Tenorio, 2005). Algunos defectos congénitos, que comúnmente se describen, incluyen defectos del sistema nervioso central (hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, hipomielogénesis), defectos oculares (atrofia y displasia retinal, cataratas, microftalmia), hipoplasia tímica, crecimiento retardado, hipoplasia pulmonar, alopecia, hipotricosis, braquignatismo, artrogriposis y otras anomalías esqueléticas (Evermann y Barrington, 2005).

b) Enfermedad de las Mucosas: Los terneros PI tienen una alta probabilidad de desarrollar enfermedad de las mucosas (EM), por superinfección con una cepa CP homóloga antigénicamente, producto de una mutación de la cepa presente en el animal o por infecciones externas (vacunación a virus vivo modificado o infección natural) (Evermann y Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005; Ridpath, 2005). Se describen dos tipos de EM según el tiempo que tardan en aparecer los signos clínicos, inicio temprano e inicio tardío (Liebler-Tenorio, 2005). El inicio temprano de EM ocurre dentro de dos a tres semanas después de la exposición a la cepa CP de VDVB y el VDVB CP es idéntico antigénicamente al VDVB NCP (virus homólogo). El inicio tardío de EM ocurre meses a años después de la exposición y el VDVB CP es distinto antigénicamente al VDVB NCP (virus heterólogo). Los signos clínicos en la fase final del inicio temprano y del inicio tardío de EM son indistinguibles y sólo hay sutiles diferencias en las lesiones de tejidos (Liebler-Tenorio, 2005).

Una vez que se establecen los signos clínicos, la EM tiene un curso de tres a diez días, con una letalidad del 100%. Los signos clínicos presentes son fiebre, anorexia, taquicardia, polipnea, disminución en la producción láctea y diarrea acuosa profusa, con presencia de trozos de mucosa, sangre y olor fétido. Otros signos son erosiones orales y epiteliales, secreción ocular y nasal, opacidad corneal, hipersalivación, hipotonía ruminal, timpanismo y cojera. El animal se encuentra con trombocitopenia y neutropenia. Puede haber infecciones bacterianas secundarias, que se manifiestan como neumonía, mastitis y metritis.

Una pequeña parte de los animales sobrevive a la fase aguda y desarrolla la forma crónica de la EM, que se caracteriza por persistencia de heces blandas, anorexia leve a moderada, falta de desarrollo, timpanismo crónico recurrente, lesiones erosivas en piel y espacio interdigital, secreción nasal y ocular, cojera, además puede presentarse alopecia y áreas de hiperqueratinización, anemia, trombocitopenia y neutropenia. Los animales afectados raramente sobreviven más allá de los 18 meses (Evermann y Barrington, 2005). Durante la enfermedad, ya sea de manifestación aguda o crónica, el animal excretará VDVB CP y VDVB NCP, pudiendo ser una fuente de infección para los miembros susceptibles del rebaño (Liebler-Tenorio, 2005).

3. VIRUS

El VDVB pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*, junto con el virus de la Enfermedad de la Frontera (VEF) y el virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC) (Ridpath, 2005), los cuales tienen una estrecha relación estructural, antigénica y genética (Hulst *et al.*, 1998; Widjoatmodjo, 2000).

El virión tiene un diámetro de 30 a 40 nm y está constituido por una cápside proteica formada por la proteína viral C, cubierta por una envoltura lipídica derivada de las células del hospedero y que posee en su interior al genoma viral formado por un ARN de hebra simple de unos 12,5 Kb, de polaridad positiva (Ridpath, 2005).

El genoma presenta en su extremo 5' una región no codificante (5'NCR) constituida por 360 a 390 bases, seguida de una región codificante de unos 4000 aminoácidos, denominada marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) y finalmente en su extremo 3' presenta una región no codificante de unas 200 bases (3'NCR) (Murphy *et al.*, 1995), la cual termina en su extremo con un corto tramo poli(C) (Ridpath, 2005). El ORF da lugar a una poliproteína, que contiene las proteínas individuales del virus en el siguiente orden de 5' a 3': N^{pro}, C, E^{ms}, E1, E2, p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. La poliproteína es procesada por proteasas celulares y virales generando once a doce proteínas maduras (Rümenapf *et al.*, 1993; Ridpath, 2005).

La primera proteína viral en ser sintetizada es N^{pro} y corresponde a una proteína no estructural propia del género *Pestivirus*, la cual es una autoproteasa, es decir, su función consiste en separarse a sí misma de la poliproteína (Ridpath, 2005). Esta proteína no es esencial para la replicación viral en cultivos tisulares (Tratschin *et al.*, 1998) y se ha descrito que modula la respuesta de interferón en células infectadas, inhibiendo su síntesis (Ruggli *et al.*, 2003). Después se sintetizan las proteínas estructurales, que son la proteína C y las glicoproteínas virales E^{ms}, E1 y E2 que se ubican en la envoltura lipídica que cubre la cápside del virus (Meyers y Thiel, 1996). C es la proteína que conforma la nucleocápside viral. E^{ms}, al igual que N^{pro}, es una glicoproteína única para el género *Pestivirus*, la cual presenta una actividad RNasa intrínseca (Ridpath, 2005) y es esencial para la virulencia del virus (Meyers *et al.*, 1999). Adicionalmente, induce la formación de anticuerpos neutralizantes, formando inmunidad protectora en el hospedero (Weiland *et al.*, 1992; Meyers *et al.*, 1999). E1 y E2 son glicoproteínas de envoltura que poseen dominios con potencial de transmembrana (Ridpath, 2005). Al igual que E^{ms}, E2 corresponde a una proteína que induce la formación de anticuerpos neutralizantes y promueve la inmunidad protectora (Donis *et al.*, 1988). Corresponde a la proteína mayoritaria de la partícula viral y posee los epítomos inmunodominantes en la producción de anticuerpos, además permite diferenciar distintas especies de *Pestivirus* (Weiland *et al.*, 1999; Ridpath, 2005). Los dos tercios restantes de la poliproteína corresponden a proteínas no estructurales, las cuales están involucradas en la replicación del virus (Goens, 2002). La función de p7 se desconoce, aunque se cree que es necesaria para la producción de virus infeccioso, pero no para la replicación del ARN (Ridpath, 2005). NS2 y NS3 se encuentran como proteínas independientes en un VDVB del biotipo CP y como

NS2-3 en un virus del biotipo NCP. NS2 no es requerida para la replicación del ARN y su función es desconocida. Su separación de NS2-3 no afecta la actividad serín proteasa. La porción NS3 tiene actividad serín proteasa, separando a las demás proteínas no estructurales de la poliproteína (Tautz *et al.*, 1997), además posee actividad RNA helicasa y NTPasa estimulada por ARN, siendo estas tres actividades esenciales para la viabilidad del virus (Ridpath, 2005). La proteína NS4A actúa como cofactor para la actividad serín proteasa de NS3 (Tautz *et al.*, 1997). NS4B y NS5A son probablemente componentes del complejo replicasa. NS5B posee actividad ARN polimerasa (Ridpath, 2005).

N^{pro} es responsable de su propia separación de la poliproteína. La escisión de las proteínas estructurales, C, E^{ns}, E1 y E2, está mediada principalmente por una peptidasa señal de origen celular. (Rümenapf *et al.*, 1993).

Inicialmente, E^{ns} y E1 forman un hétérodímero, el cual es procesado en etapas tardías y E^{ns} da lugar a un homodímero unido por enlaces disulfuro. E2 puede estar presente como un homodímero E2-E2 o como hétérodímero E1-E2, en ambos casos el extremo C terminal de E2 funciona como un dominio transmembrana, anclándolos a la membrana lipídica del virus (Rümenapf *et al.*, 1993). La asociación de los homodímeros de E^{ns} con el virión no es llevada a cabo por un dominio transmembrana, sino que la proteína se ancla a la membrana mediante una hélice anfipática en su extremo C terminal (Tews y Meyers, 2007). De las tres glicoproteínas, E^{ns} es la que se encuentra glicosilada en mayor extensión y da lugar a un homodímero E^{ns}-E^{ns}, que puede encontrarse asociado a virus o libre en el medio de cultivo (Windisch *et al.*, 1996).

Durante el procesamiento de la poliproteína, p7 se separa ineficientemente de E2, pudiendo encontrarse como p7 o E2-p7 (Ridpath, 2005). Las proteínas restantes son procesadas por la serín proteasa NS3, la cual es responsable de la división entre NS3 y NS4A, entre NS4A y NS4B, entre NS4B y NS5A y entre NS5A y NS5B. En los dos últimos sitios se requiere a NS4A como cofactor, mediando la división entre NS4B y NS5A y entre NS5A y NS5B (Tautz *et al.*, 1997).

El genoma del VDVB presenta una alta frecuencia de mutaciones puntuales, lo cual se expresa en la existencia de dos genotipos del virus, VDVB genotipo 1 (VDVB1) y VDVB genotipo 2 (VDVB2) (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). La variabilidad antigénica es particularmente pronunciada entre las cepas del genotipo 1 y las del genotipo 2, lo que afecta tanto en la detección como en el control de la enfermedad. Se ha descrito la existencia de subgenotipos tanto para VDVB1 como para VDVB2, reconociéndose hasta la fecha 16 subgenotipos para VDVB1 (1a-1p) y dos subgenotipos para VDVB2 (2a y 2b). El genotipo VDVB1 se encuentra distribuido mundialmente y agrupa a la mayoría de las cepas de laboratorio (NADL, Singer, C24V, etc.) y virus que provocan cuadros clínicos leves; el genotipo VDVB2, agrupa virus asociados a cuadros clínicos leves y también a virus asociados al síndrome hemorrágico de los bovinos y a diarreas graves en animales adultos inmunocompetentes (Pellerin *et al.*, 1994).

La variabilidad genómica también se expresa en variabilidad biológica y antigénica, lo que explicaría las distintas patologías causadas por el virus (Bolin y Ridpath, 1992). En cuanto a las características biológicas de los distintos aislados del VDVB, éste presenta dos biotipos tanto para VDVB1 como para VDVB2: un biotipo CP que provoca redondeo y lisis en las células de los cultivos celulares; y el biotipo NCP que no provoca alteraciones visibles en las células infectadas (Meyers y Thiel, 1996). Las cepas NCP y CP codifican para la proteína no estructural NS2-3. En las cepas CP, NS2-3 es procesada en dos proteínas, NS2 y NS3, lo cual puede ocurrir por distintas causas, como inserción de secuencias o reordenamiento en el genoma viral, siendo más común la primera. Las inserciones más frecuentemente descritas en las cepas CP de VDVB1 consisten de una secuencia duplicada del genoma viral y/o secuencias codificadoras de ubiquitina (Ridpath, 2005). El biotipo no se correlaciona con la virulencia del virus *in vivo*, ya que todos los virus altamente virulentos estudiados hasta la fecha han sido NCP (Bolin y Ridpath, 1992).

Los biotipos CP y NCP difieren en la manera en que activan el sistema inmune. El VDVB NCP induce una respuesta humoral más pronunciada y la respuesta al VDVB CP corresponde a una respuesta inmune mediada por células (Lambot *et al.*, 1997). La infección de vacas gestantes con el biotipo NCP puede resultar en muerte embrionaria, mortinatos, inducir daño teratogénico o nacimiento de animales PI (Schweizer y Peterhans, 2001). El VDVB CP induce la síntesis de IFN- α/β (IFN tipo I) en macrófagos

infectados y destruye a las células del hospedador por apoptosis. Los biotipos NCP de VDVB no inducen la síntesis de IFN y las células no muestran signos de infección viral (Schweizer y Peterhans, 2001).

La resistencia a los potentes efectos proapoptóticos e inductores de IFN estimulado por el ARN de doble hebra pueden ser un factor clave en la invasión exitosa del feto y la persistencia de por vida del virus (Schweizer y Peterhans, 2001). Los VDVB del biotipo CP tienen una replicación aumentada con respecto a los NCP y, por lo tanto, producen cantidades mayores de ARN de doble hebra (Gallei *et al.*, 2008), con lo que el mecanismo de degradación de éste llevado a cabo por las proteínas E^{ms} y N^{pro} se ve sobrepasado y no es posible bloquear la respuesta IFN inducida por ARN de doble hebra. Esta activación de la respuesta inmune innata sería la responsable de la destrucción del tejido fetal y explicaría la incapacidad de los VDVB CP de establecer infecciones persistentes (Meyers *et al.*, 2007).

4. VIRULENCIA

La virulencia de la cepa es el determinante más importante para el resultado de una infección por VDVB (Liebler-Tenorio, 2005). Las cepas de campo del VDVB presentan distintos grados de virulencia. Así, un animal adulto inmunocompetente infectado con una cepa de baja virulencia cursa en la mayoría de los casos en forma subclínica, sin embargo, al ser infectado con una cepa de alta virulencia cursa con un cuadro clínico que en algunos casos puede llegar a ser mortal (Pellerin *et al.*, 1994; Evermann y Barrington, 2005). Estas distintas virulencias se deben en parte a diferencias en el tropismo celular y la magnitud de la viremia generada, lo que se explicaría por una replicación más eficiente del virus en el animal infectado (Bolin y Ridpath, 1992).

En cepas de distinta virulencia, si bien la diseminación de la infección viral en el animal infectado es similar, presentan diferencias tanto en la cantidad de virus en los tejidos y en sangre (viremia), como también en la velocidad de diseminación (Liebler-Tenorio, 2005).

La virulencia no se correlaciona con el biotipo del virus, sin embargo, hay diferencias entre ambos biotipos. El virus NCP se disemina más ampliamente en el hospedero que su homólogo CP (Liebler-Tenorio, 2005).

5. GLICOPROTEÍNA E^{ms}

La glicoproteína E^{ms} es una glicoproteína viral ubicada en la envoltura lipídica del virus, la cual posee actividad RNasa (Windisch *et al.*, 1996; Hulst *et al.*, 1998) con una fuerte preferencia por secuencias de hebra simple que presentan Uridina (Windisch *et al.*, 1996). E^{ms} está formada por 227 aminoácidos, con una masa molecular de 25,7 kDa (Rümenapf *et al.*, 1993). Es altamente glicosilada, ya que alrededor del 50% de su masa molecular está compuesta por carbohidratos, sin embargo la glicosilación no es esencial para la actividad enzimática de la proteína (Rümenapf *et al.*, 1993; Windisch *et al.*, 1996).

El sitio activo de E^{ms} corresponde a dos tramos cortos de aminoácidos, que se encuentran conservados dentro de los *Pestivirus*, con dos Histidinas, ubicadas en las posiciones 30 y 79 de la proteína y que son claves para su función enzimática (Hulst *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2002). Ambos segmentos de aminoácidos muestran cierta homología con otras RNasas de la familia Rh/T2/S (Windisch *et al.*, 1996). La delección o sustitución de una o ambas Histidinas resulta en la inactivación de la actividad enzimática de dicha proteína (Hulst *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2002).

E^{ms} carece del anclaje típico de membrana y es secretada de manera considerable desde las células infectadas al medio extracelular y circula en los fluidos corporales de los animales infectados (Rümenapf *et al.*, 1993).

En las células, la glicoproteína se encuentra tanto en forma dimérica como monomérica, primando la composición dimérica (Lazar *et al.*, 2003). En el virión, la glicoproteína E^{ms} se encuentra como un homodímero, con una masa molecular de alrededor de 100 kD. La dimerización ocurre mediante enlaces disulfuro (Rümenapf *et al.*,

1993) entre las Cisteínas presentes en la posición 171 de ambos monómeros de E^{ms} (Langedijk *et al.*, 2002). Sin embargo, la formación de homodímeros no es un requisito para la actividad enzimática de E^{ms} (Windisch *et al.*, 1996) y tampoco es esencial para la viabilidad del virus, ya que algunas cepas de *Pestivirus* carecen de Cisteína en la posición 171 (Langedijk *et al.*, 2002; Tews *et al.*, 2009).

La glicoproteína E^{ms} posee nueve Cisteínas, en las posiciones 38, 68, 69, 82, 110, 114, 138, 155 y 171, ocho de las cuales forman cuatro enlaces disulfuro intramoleculares y la Cisteína 171 forma un puente intermolecular con la Cisteína 171 del otro monómero de E^{ms}. Los enlaces intramoleculares son (Figura 1): el primero entre la Cisteína de la posición 38 con la de la posición 82, el segundo entre la Cisteína de la posición 110 con la de la posición 155, el tercero entre la Cisteína de la posición 114 con la de la posición 138 y el cuarto entre la Cisteína de la posición 68 con la de la posición 69 (Langedijk *et al.*, 2002).



Figura 1: Representación esquemática de la glicoproteína E^{ms} en su forma dimérica, en la cual se pueden observar los enlaces disulfuro inter e intramoleculares (Langedijk *et al.*, 2002).

E^{ms} juega un rol en la regulación de la síntesis de ARN de las células infectadas (Hulst *et al.*, 1998) y presenta actividad inmunodepresora, dado que induce apoptosis de linfocitos (Bruschke *et al.*, 1997; Meyers *et al.*, 1999). Esta capacidad no se limita a las especies que pueden ser afectadas por *Pestivirus*, ya que se evidenció apoptosis por VPPC en linfocitos de bovino, humano, porcino y ovino (Bruschke *et al.*, 1997).

E^{ms} carece del típico anclaje a la membrana o dominio transmembrana (Rümenapf *et al.*, 1993) y su dominio C terminal es el responsable de la translocación a través de la membrana plasmática de células eucariontes (Langedijk, 2002), dado que el extremo C terminal de E^{ms} es la región más positivamente cargada de la proteína (Hulst *et al.*, 2000; Langedijk, 2002). Los aminoácidos de este segmento están involucrados con el anclaje a

la membrana y lo hacen formando una hélice anfipática (Langedijk, 2002; Tews y Meyers, 2007).

E^{ms} es capaz de unirse a distintos tipos celulares, sin embargo, la infección de las células de mamífero es especie-específica, lo que sugiere que la infección celular sería dependiente de un proceso de múltiples pasos (Iqbal *et al.*, 2000). La adhesión e ingreso del virus al interior de las células susceptibles ocurre mediante la interacción de las glicoproteínas de envoltura, E^{ms} y E2 con glicosaminoglicanos en la superficie celular, presumiblemente Heparán Sulfato y Heparina (Iqbal *et al.*, 2000; Hulst *et al.*, 2000). Este proceso inicial de unión de E^{ms} con Heparán Sulfato facilita el ingreso del virus, pero no es decisivo (van Gennip *et al.*, 2005). Los heterodímeros E1-E2 son esenciales para el ingreso del virus y su posterior división es necesaria para la replicación de éste. Los dímeros E^{ms} -E1 no son indispensables para la multiplicación del virus, no obstante, podrían ser un factor regulador de la formación de E1-E2 al mantener retenida a la glicoproteína E1 (Wegelt *et al.*, 2009).

La actividad RNasa no es necesaria para la multiplicación del virus en cultivos celulares, dado que su inhibición no afecta su viabilidad ni su capacidad para multiplicarse en cultivos celulares (Hulst *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2002), sin embargo, si esta actividad enzimática es derogada, se produce la atenuación de la virulencia del virus (Meyers *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2002; von Freyburg *et al.*, 2004).

Los virus que presentan su actividad RNasa inhibida son capaces de replicar y diseminarse normalmente en el hospedero, pero los animales cursan con una enfermedad con signos clínicos más leves seguida de una rápida recuperación (Meyers *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2002; von Freyburg *et al.*, 2004). Esta inhibición de la actividad enzimática de E^{ms} no previene el establecimiento de infección fetal ni daño al feto, incluso cuando ocurre una fuerte atenuación de los signos en la madre, que es un animal adulto inmunocompetente (Meyers *et al.*, 2007).

6. SITUACIÓN EN CHILE

El virus se aisló por primera vez en Chile el año 1985 a partir de un brote de EM en terneros de la X Región (Reinhardt, 1992), aislándose posteriormente en numerosas ocasiones desde bovinos sanos y enfermos, así como de fetos abortados (Celedón *et al.*, 1997) y de vacas PI (Celedón *et al.*, 1998). El virus se encuentra ampliamente diseminado en el país, con prevalencias serológicas de un 69,2% en las regiones IX y X y un 59,7% en bovinos de leche y un 86% en bovinos de carne de la Región Metropolitana (Celedón *et al.*, 1997), siendo la prevalencia predial de bovinos portadores inmunitolerantes (PIT) de un 65%, tratándose en su mayoría de animales sin manifestación de signos clínicos (Celedón *et al.*, 1998).

Estudios genómicos posteriores han permitido establecer la presencia en Chile de virus pertenecientes a los subgenotipos 1a, 1b, 1i y 1j del genotipo VDVB1 y también aislados del genotipo VDVB2 con una composición genética muy similar a la de los virus presentes en Argentina (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006; Donoso, 2009). Existen diferencias antigénicas marcadas entre los aislados chilenos de los genotipos 1 y 2, con porcentajes de identidad genómica de entre 88,6 y 100% entre aislados del genotipo 1, de 98,2 a 100% entre aislados del genotipo 2 y un porcentaje de identidad genómica de entre 73,3 y 78,2% entre los aislados de ambos genotipos (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006; Donoso, 2009). El menor porcentaje de identidad genómica entre los aislados del genotipo 1 sugiere que se encuentran circulando por mayor tiempo en el ganado bovino del país (Donoso, 2009).

En Chile está autorizado el uso de vacunas inactivadas del VDVB, sin embargo los aislados virales nacionales de los subgenotipos VDVB1j y VDVB2 presentan una baja antigenicidad cruzada con la cepa NADL, la cual se utiliza ampliamente como cepa vacunal en las vacunas que comercializan los laboratorios internacionales. (Donoso, 2009).

El análisis genómico de la secuencia nucleotídica del gen de la glicoproteína E^{ms} de virus nacionales pertenecientes a los subgenotipos 1a, 1b, 1i, 1j y 2a, permitió determinar que en los virus del subgenotipo 1j, el aminoácido Histidina ubicado en la

posición 79 de la glicoproteína E^{ms} ha sido reemplazado por el aminoácido Tirosina, lo que podría afectar de manera importante la actividad RNasa de la proteína y por consecuencia la virulencia del virus.

HIPÓTESIS

Los virus del VDVB que presentan una mutación en la posición 79 de la glicoproteína E^{ms}, con un cambio del aminoácido Histidina por Tirosina, presentan una actividad RNasa menor a la que poseen los virus con la secuencia normal de la glicoproteína E^{ms}.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto de una mutación en el sitio activo de la enzima viral E^{ms} sobre la actividad RNasa del VDVB.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar de la actividad RNasa de aislados del VDVB con Histidina o Tirosina en la posición 79 de la glicoproteína E^{ms}.
- Comparar de la actividad RNasa entre los aislados del VDVB con Histidina o Tirosina en la posición 79 de la glicoproteína E^{ms}.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. AISLADOS VIRALES

En esta memoria de título se trabajó con aislados nacionales del VDVB (Tabla 1), los cuales se encontraban congelados a -80°C en el Laboratorio de Virología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Estos virus corresponden a aislados pertenecientes a los subgenotipos 1b (cepas CH/113 y CH/1025) y 1j (cepas CH/511 y CH/1087). Los dos virus del subgenotipo 1b presentan el aminoácido Histidina en la posición 79 de la proteína E^{rns}, correspondiente al virus silvestre. Los dos virus del subgenotipo 1j presentan el aminoácido Tirosina en la posición 79 de la proteína E^{rns} y, por lo tanto, corresponden a una mutación de la secuencia normal de la proteína. Además, se incluyó como referencia a la cepa NADL, que presenta el aminoácido Histidina en la posición 79 de la proteína E^{rns} y posee actividad RNasa descrita previamente.

Tabla 1: Aislados nacionales del VDVB según año y lugar de aislamiento y cuadro clínico asociado.

<u>Virus</u>	<u>Año de aislamiento</u>	<u>Origen del virus</u>	<u>Cuadro clínico</u>	<u>Tipo de muestra</u>	<u>Subgenotipo</u>
CH/113	1995	Región Metropolitana – María Pinto	*PI	Sangre	1b
CH/1025	2007	Región Metropolitana – Melipilla	**PR	Sangre	1b
CH/511	1993	Región del L.B. O'Higgins – Rancagua	Aborto	Órganos	1j
CH/1087	2007	Región del Maule – Cauquenes	Sano	Sangre	1j

*PI: Portadores inmunotolerantes, **PR: Problemas reproductivos

2. CULTIVOS Y SUBCULTIVOS CELULARES

Para la amplificación de los virus se usaron cultivos celulares de la línea MDBK (CCL-22 ATCC), libres de infección por el VDVB, las cuales se encontraban congeladas en nitrógeno líquido en el Laboratorio de Virología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Para ello, a botellas de cultivo de 10 ml se les retiró el medio de cultivo y las monocapas de células se lavaron con 5 ml de solución salina A de Puck (Puck *et al.*, 1958) y luego con 1,0 ml de tripsina-verseno (tripsina 0,05% y verseno 0,02% en solución salina A de Puck). Luego se adicionó 0,5 ml de tripsina-verseno, incubándose por 15-20 minutos a 37°C y a las células desprendidas se agregó 4,5 ml de medio de cultivo esencial mínimo (MEM). La concentración celular se ajustó a 100.000 células/ml, agregando MEM suplementado con un 6% de suero equino, se sembraron 10 ml en botellas de cultivo y luego fueron incubadas por 72 horas a 37°C. Finalizada la incubación, los cultivos celulares resultantes se utilizaron para amplificación del VDVB o para mantención de la línea celular.

3. AMPLIFICACIÓN VIRAL EN MONOCAPAS DE CÉLULAS MDBK

Para la amplificación de los aislados virales se infectaron monocapas de células MDBK con 0,01 DIC₅₀ virus/célula. Las células se lavaron una vez con 5 ml de solución salina A de Puck a 37°C y se inocularon con el virus correspondiente. Las células se incubaron a 37°C durante una hora para la adsorción del virus, moviendo las botellas cada 10 minutos para evitar que las células se deshidrataran. Posteriormente, se eliminó el inóculo viral, se lavó la monocapa con 5 ml de solución salina y se agregaron 10 ml de MEM suplementado con suero equino al 2,5%. Las células se incubaron a 37°C por 96 horas, tras lo cual las botellas fueron sometidas a tres ciclos de congelación y descongelación, con el fin de lisar las células. Posteriormente, el lisado celular se centrifugó a 2000xg por 20 minutos a 4°C (Heraeus® Biofuge® Primo R) y el sobrenadante se guardó a -80°C en alícuotas de 1 ml, en el Laboratorio de Virología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

4. TITULACIÓN VIRAL POR INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA

La cantidad de virus infecciosos de cada uno de los aislados virales se determinó por el cálculo del título viral, por el método de Reed y Muench (1938), evidenciando la presencia de antígeno viral en las células mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Para ello, células MDBK se sembraron en microplacas de 96 pocillos hasta obtener una monocapa. Luego, se prepararon ocho diluciones para cada virus, entre 10^{-1} y 10^{-8} , lo que se realizó en ocho tubos de plástico de 1,5 ml con 450 μ l de MEM suplementado con suero equino al 6% cada uno. Para la primera dilución se agregaron 50 μ l del virus amplificado en el primer tubo plástico y se agitó en el vórtex; para las demás diluciones se tomaron 50 μ l de la dilución anterior y se agregaron en el tubo con medio y luego se agitó en el vórtex. Luego, a las células se les retiró el medio de cultivo, se lavaron una vez con 50 μ l de solución salina por pocillo y se infectaron cuatro pocillos con 100 μ l de la dilución viral correspondiente (cuadruplicado).

Las células se incubaron por 72 horas en una estufa a 37°C y 5% de CO₂ (Heraeus® HERAcCell® 150). Una vez finalizada la incubación, el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron con 100 μ l de PBS pH 7,6 y luego con 100 μ l de acetona al 20% en PBS pH 7,6. Las células se fijaron con 200 μ l de acetona al 20% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente, luego se eliminó la acetona y se secaron por cuatro horas con lámpara o durante la noche a temperatura ambiente y se guardaron a -20°C.

Una vez que las células estaban fijadas, se incubaron por 10 minutos con 50 μ l de "buffer" de lavado (0,9ml Tween 80 25%/400 ml PBS pH 7,6). Posteriormente se eliminó el "buffer" de lavado, se agregaron 50 μ l de una mezcla de cuatro anticuerpos monoclonales anti VDVB (WB103-WB112-WB166-WB214) y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con 50 μ l de "buffer" PBS pH 7,6 dos veces por cinco minutos, luego se agregaron 50 μ l del anticuerpo secundario (HRP conjugado a IgG cabra anti IgG ratón) y se incubarán a temperatura ambiente por 60 minutos.

Las células se lavaron con 50 μ l de "buffer" PBS pH 7,6 dos veces por cinco minutos, se agregaron 50 μ l de sustrato (Diaminobencidina 0,6 mg/ml y perborato de

sodio tetrahidratado 0,4 mg/ml en PBS pH 7,6) y se incubó a temperatura ambiente hasta desarrollo de color.

La solución de tinción se retiró, eliminándola en un recipiente para residuos peligrosos. Las células se lavaron con 100 µl de PBS pH 7,6 y se visualizaron en un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS 100). La presencia del virus se detectó por la presencia de un precipitado de color marrón en el citoplasma de las células, producto de la oxidación del sustrato. El título del virus se calculó por el método de Reed y Muench (1938), representando el valor recíproco de la dilución viral en que había infección en el 50% de los cultivos inoculados, y se expresó en dosis infectante de cultivo de tejido 50%/ml (DIC₅₀/ml).

5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASA DEL VDV B

Para determinar la actividad RNasa del virus se utilizó el procedimiento descrito por Meyers *et al.* (1999). En breve, se sembraron células MDBK en placas de 24 pocillos (1,5 centímetros de diámetro). Una vez obtenida la monocapa se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con solución salina y se infectaron con una cantidad de 0,1 DIC₅₀ virus por célula, para cada uno de los virus a analizar en esta memoria. Las células se incubaron una hora a 37°C para la adsorción del virus. Posteriormente las células se lavaron dos veces con solución salina y se agregaron 0,5 ml de MEM suplementado con suero equino al 3%. Las células se incubaron por 72 horas a 37°C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se recolectaron 0,4 ml del sobrenadante de cada pocillo en tubos plásticos. Las células se lavaron dos veces con solución salina y se lisaron en 0,4 ml de “buffer” lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, BSA 2 mg/ml, Tritón X-100 0,1%, ácido desoxicólico 0,1%, SDS 0,1%). Una vez lisadas las células, se recolectaron los 0,4 ml del lisado celular y se juntaron con el sobrenadante previamente obtenido, para luego ser sometido a tres ciclos de congelación y descongelación y clarificado por centrifugación a 21885xg por 15 minutos a 4°C.

A 50 μ l del sobrenadante se agregaron 80 μ g de poly(U) (como sustrato) en "RNeasy buffer" (Tris-acetato 40 mM [pH 6,5], EDTA 0,5 mM, DTT 5mM) en un volumen total de 200 μ l y se incubó durante una hora a 37°C. Para obtener únicamente el producto de la degradación del sustrato, se agregaron 200 μ l de ácido perclórico 1,2 M - sulfato de lantano 20 mM para precipitar el ARN de alto peso molecular residual. Luego de 15 minutos de incubación en hielo, la mezcla se centrifugó a 19064xg por 15 minutos a 4°C (Heraeus® Biofuge® Primo R) y se recolectó el sobrenadante. A 300 μ l del sobrenadante obtenido se agregaron tres volúmenes de agua y a una alícuota se midió la densidad óptica a 260 nm (DO_{260}) en un espectrofotómetro (UNICAM UV/Vis Spectrometer), ubicado en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La actividad RNasa se expresó a través de la DO_{260} y se obtuvo el promedio para cada uno de los aislados virales.

Como control positivo del método de medición de actividad RNasa se utilizó RNasa A de páncreas de bovino. Como control positivo de actividad RNasa del VDVB se utilizaron células MDBK infectadas con la cepa NADL y como control negativo, células MDBK no infectadas.

5.1. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO VIRAL EN LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD RIBONUCLEASA

Para determinar el título viral en los cultivos de células para la medición de la actividad RNasa, las células infectadas se sometieron al mismo tratamiento descrito anteriormente, con la diferencia que se utilizó tripsina para desprender las células en lugar de "buffer" lisis, con el fin de mantener la estructura del virión. En breve, las células infectadas se incubaron por 72 horas a 37°C, tras lo cual se recolectó el sobrenadante en tubos, las células infectadas fueron lavadas con 200 μ l de solución salina y se agregaron 200 μ l de tripsina para que se desprendieran, se incubaron por 20 minutos a 37°C.

Posteriormente se pipeteó las células hasta que se desprendieron completamente. Una vez desprendidas, se centrifugaron a 2000xg por 10 minutos a 4°C, luego se eliminó el sobrenadante y el sedimento obtenido se resuspendió en el sobrenadante reservado

previamente y se sometió a tres ciclos de congelación/descongelación. El lisado se clarificó por centrifugación a 2000xg por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue guardado a -80°C hasta el momento de ser titulado mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta, la cual ya fue descrita anteriormente.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Según datos obtenidos de la literatura y para alcanzar un nivel de confianza de 95% y una potencia de 90%, se realizaron entre cuatro y ocho determinaciones de actividad RNasa para los distintos aislados virales y se calculó el promedio para cada uno. Los promedios obtenidos se analizaron usando el análisis de varianza complementado con el método de comparaciones múltiples de Scheffé, para establecer si hay diferencias significativas entre los virus de un mismo subgenotipo y entre los virus que presentan o no la mutación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislados virales pertenecientes a las cepas CH/113, CH/511, CH/1025, CH/1087 y NADL del VDVB que se encontraban congelados en el Laboratorio de Virología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, fueron multiplicados en células MDBK libres de infección por VDVB y posteriormente titulados por la técnica de la inmunoperoxidasa indirecta.

Posteriormente se determinó la actividad RNasa para cada uno de los virus, realizando entre cuatro y ocho mediciones y se calculó el promedio de los valores obtenidos. Como control positivo de la actividad RNasa se utilizaron células MDBK infectadas con la cepa NADL y como control negativo, células MDBK sin infectar.

De las cuatro cepas del VDVB en estudio, las dos pertenecientes al subgenotipo 1b, que poseían la secuencia silvestre del virus, presentaron niveles de actividad RNasa comparables a los de la cepa de referencia NADL. Mientras que ambas cepas del subgenotipo 1j presentaban una mutación con respecto a la secuencia silvestre del virus y no mostraron actividad RNasa, al igual que el control negativo (Tabla 2, Figura 2).

Tabla 2: Actividad RNasa de aislados nacionales de los subgenotipos 1b y 1j y cepa NADL del VDVB.

Virus	Actividad RNasa (DO₂₆₀)	Desviación Estándar
NADL (VDVB1a)	0,588 (A)	0,178
CH/1025 (VDVB1b)	0,570 (A)	0,123
CH/113 (VDVB1b)	0,803 (A)	0,151
CH/511 (VDVB1j)	-0,116 (B)	0,023
CH/1087 (VDVB1j)	-0,111 (B)	0,021

*(A) y (B) indican similitud o diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$).

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza, cuyos resultados indicaron la presencia de diferencias significativas entre al menos dos de las cepas estudiadas ($p \leq 0,05$). Posteriormente, se complementó este análisis con el método de comparaciones múltiples de Scheffé, con lo que se determinó que no hay diferencias significativas dentro de un mismo subgenotipo. Sin embargo, las cepas del subgenotipo 1b junto con la cepa NADL difieren en actividad RNasa con las cepas del subgenotipo 1j, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Estos resultados sugieren que la sustitución de Histidina por Tirosina, sería responsable de la pérdida de actividad ribonucleasa de la partícula viral, ya que los virus que poseían Histidina en la posición 79 de la glicoproteína E^{ms} (NADL, CH/113 y CH/1025) presentaron actividad RNasa, mientras que los virus que poseían Tirosina en dicha posición (CH/511 y CH/1087) presentaron una actividad RNasa similar a la del control negativo (células MDBK sin infectar).

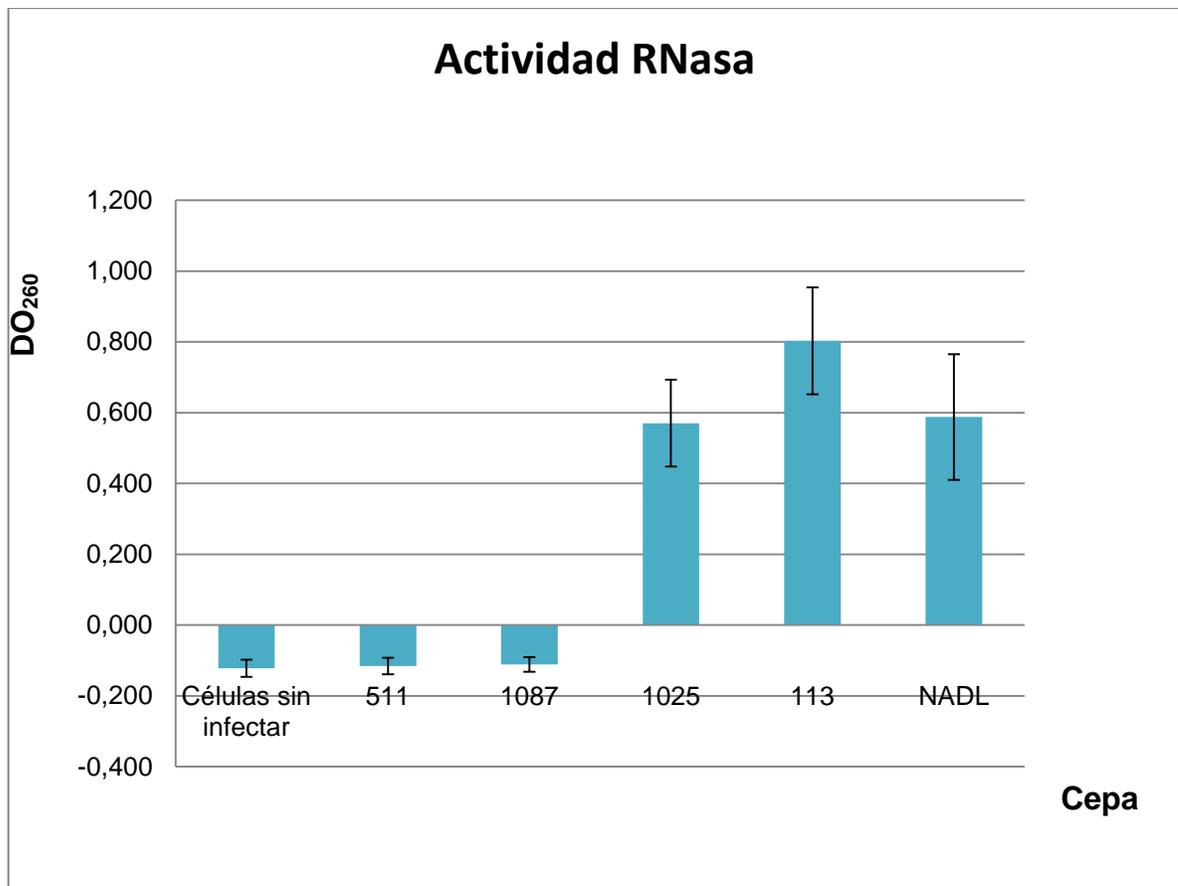


Figura 2: Promedios de actividad RNasa de las distintas cepas del VDVB, utilizando la cepa NADL como control positivo y células sin infectar como control negativo, la actividad RNasa se expresó a través de la densidad óptica a 260 nm (DO₂₆₀).

En diversos estudios realizados en *Pestivirus*, se ha reportado que la delección (pérdida) del aminoácido Histidina o su sustitución por los aminoácidos Lisina o Leucina en uno o ambos sitios activos de la glicoproteína E^{rns} provocan una pérdida en su actividad enzimática, tanto para el VPPC (Hulst *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1999) como para el VDVB (Meyer *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en esta Memoria demuestran que el cambio de Histidina por Tirosina provoca el mismo efecto, confirmando la naturaleza crítica del aminoácido Histidina en la posición 79 de la glicoproteína E^{rns}.

Se ha reportado que la pérdida de la actividad RNasa de la proteína E^{rns} provoca disminución de la virulencia del virus y, por lo tanto, la atenuación de los signos clínicos *in vivo*. En este estudio no se realizaron experimentos animales, sin embargo llamó la atención que los virus CH/511 y CH/1087 fueron obtenidos a partir de animales que no presentaban enfermedad. Esto coincidiría con lo observado en experimentos animales

realizados en lechones (Meyers *et al.*, 1999) y terneros (Meyer *et al.*, 2002) infectados con VPPC y VDVB RNasa negativos, respectivamente. En los cuales la enfermedad cursó de manera subclínica con un leve aumento de la temperatura corporal y linfopenia de corta duración, seguidos de una rápida recuperación del animal.

Al infectar vacas gestantes con virus RNasa negativos se evidenció una atenuación de los signos clínicos en la madre, pero no en el feto, resultando en aborto en un número importante de hembras (Meyers *et al.*, 2007). Esto concuerda con lo observado con el virus CH/1087, el que se aisló a partir de un feto abortado.

La función de la glicoproteína E^{ms} se postula que permite al virus evadir la respuesta inmune innata del hospedero. Se ha observado que la actividad RNasa de la proteína degrada el ARN de doble hebra que se produce durante la replicación viral (Iqbal *et al.*, 2004), evitando con esto el estímulo de la respuesta inmune antiviral, lo que permite una mayor diseminación del virus.

Los virus que presentan mutaciones a nivel de los sitios activos de E^{ms} carecen de esta capacidad, por lo que el virus es reconocido por el sistema inmune y se establece rápidamente una respuesta inmune contra éste, finalizando con la eliminación del virus del organismo antes que pueda propagarse en el hospedero. Es por esto, que se observa una atenuación en los signos clínicos en los animales infectados con virus RNasa negativos. Sin embargo, en el caso de la infección en animales gestantes la respuesta inmune que causa atenuación en los signos clínicos de la madre sería también responsable del mayor daño en el feto (Meyers *et al.*, 2007).

Si bien en la determinación de actividad RNasa, en todos los casos las células se infectaron con la misma cantidad de virus, las diferencias de actividad enzimática observadas podrían explicarse por diferencias en la cantidad de virus luego del período de incubación. Para descartar esta posibilidad, se procedió a determinar la cantidad de virus infeccioso en los cultivos al momento de medir la actividad RNasa para las cinco cepas en estudio (Tabla 3).

Tabla 3: Título viral de las distintas cepas del VDVB.

VIRUS	Título Viral (DIC₅₀/ml)
NADL (VDVB1a)	10 ^{6,5}
CH/113 (VDVB1b)	10 ^{5,5}
CH/1025 (VDVB1b)	10 ^{6,5}
CH/511 (VDVB1j)	10 ^{6,5}
CH/1087 (VDVB1j)	10 ^{7,5}

Los resultados obtenidos indican que los virus del subgenotipo 1j presentan igual o mayor cantidad de virus en los lisados celulares que los virus de los subgenotipos 1a y 1b, lo que no explicaría las diferencias observadas en actividad enzimática. Por otra parte, estos resultados concuerdan con los reportados en un estudio previo por Santana (2013), en que los virus pertenecientes al subgenotipo 1j presentan una mayor eficiencia replicativa que los virus pertenecientes a los demás subgenotipos. Además, esto demuestra que la mutación tampoco afecta la multiplicación del virus en cultivos celulares.

El hecho de que las dos cepas en que se encontró la mutación pertenezcan a cepas de campo del subgenotipo 1j del VDVB, sugiere por un lado, que esta mutación podría estar asociada al subgenotipo 1j, y por otra parte, por tratarse de virus de campo, la mutación podría representar una ventaja selectiva para el virus. Se desconoce cómo el virus podría beneficiarse de esta característica, sin embargo, una posibilidad sería que la atenuación en la virulencia del virus permita una mayor diseminación del virus dentro del rebaño al ocasionar signos clínicos de menor magnitud en el animal, los cuales no interfieren con su comportamiento normal. Adicionalmente, como postula Ortega (2012), la mayor eficiencia replicativa de los virus de este subgenotipo les permitiría competir de mejor manera con el sistema inmune, diseminándose rápidamente y provocando una infección sistémica con alta viremia, lo cual compensaría su menor virulencia.

Se requieren estudios adicionales para determinar si esta mutación es propia de los virus del subgenotipo 1j. En estos estudios se debiesen determinar las secuencias aminoacídicas de E^{ms} de otros aislados del mismo subgenotipo, sin embargo, a la fecha sólo se encuentra disponible la secuencia aminoacídica para una cepa viral perteneciente al subgenotipo 1j (KS86), la cual no presenta dicha mutación.

La similitud de los resultados obtenidos en esta Memoria con los de otros estudios que introducen mutaciones en la posición 79 de la glicoproteína E^{ms}, sugiere fuertemente que la pérdida de la actividad RNasa de las cepas virales pertenecientes al subgenotipo 1j se debe a la mutación de Histidina por Tirosina. Sin embargo, deberán realizarse nuevos estudios que permitan descartar la presencia de mutaciones adicionales en otros sitios del genoma viral que podrían ser responsables de la pérdida de la actividad RNasa. Una alternativa sería realizar clones infecciosos de los virus del subgenotipo 1j, revertir la mutación y posteriormente medir la actividad RNasa del virus resultante.

CONCLUSIONES

1. El cambio del aminoácido Histidina por Tirosina en la posición 79 de la glicoproteína E^{ms} (H79Y) no afecta la multiplicación del virus en cultivos celulares.
2. Los virus que poseen la mutación H79Y no presentan la actividad ribonucleasa asociada a la glicoproteína E^{ms}.
3. Se postula que los virus que poseen la mutación H79Y presentan una virulencia atenuada, lo que los convierte en posibles cepas vacunales del VDVB.

BIBLIOGRAFÍA

BAKER, J.C. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190(11):1449-1458.

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.* 53(11):2157-2163.

BRUSCHKE, C.J.M.; HULST, M.M.; MOORMANN, R.J.M.; VAN RIJN, P.A.; VAN OIRSCHOT, J.T. 1997. Glycoprotein E^{ms} of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J. Virol.* 71(9):6692-6696.

CELEDÓN, M.; PALACIOS, L.; PIZARRO, J.; IBARRA, L. 1997. Prevalencias de anticuerpos seroneutralizantes para el virus de la diarrea viral bovina en ganado de carne de la región Metropolitana de Chile. *Av. Cs. Vet.* 12(2):98-100.

CELEDÓN, M.; CARBONELL, J.; IBARRA, L., PIZARRO, J. 1998. Detección de bovinos portadores e inmunotolerantes al virus de la diarrea viral bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. *Arch. Med. Vet.* 30(1):125-132.

DONIS, R.O.; CORAPI, W.; DUBOVI, E.J. 1988. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 69(1):77-86.

DONOSO, A. 2009. Determinación de la variabilidad genética de aislados chilenos del virus diarrea viral bovina (VDVB) por filogenia molecular de la región 5p no codificante del genoma viral. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Vet. y Pec. 64 p.

EVERMANN, J.F.; BARRINGTON, G.M. 2005. Clinical Features. In: Goyal, S.M.; Ridpath, J.F. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis Management and Control. Ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp 105-119.

GALLEI, A.; BLOME, S.; GILGENBACH, S.; TAUTZ, N.; MOENNIG, V.; BECHER, P. 2008. Cytopathogenicity of classical swine fever virus correlates with attenuation in the natural host. *J. Virol.* 82(19):9717-9729.

GOENS, D. 2002. The evolution of bovine viral diarrhea: a review. *Can. Vet. J.* 43(12):946-954.

HULST, M.M.; PANOTO, F.E.; HOEKMAN, A.; VAN GENNIP, H.G.P.; MOORMANN, R.J.M. 1998. Inactivation of the RNase Activity of Glycoprotein E^{ms} of Classical Swine Fever Virus Results in a Cytopathogenic Virus. *J. Virol.* 72(1):151-157.

HULST, M.M.; VAN GENNIP, H.G.P.; MOORMAN, R.J.M. 2000. Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate due to a single amino acid change in envelope protein E^{ms}. *J. Virol.* 74(20):9553-9561.

IQBAL, M.; FLICK-SMITH, H.; MCCAULEY, J.W. 2000. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E^{ms} with cell surface glycosaminoglycans. *J. Gen. Virol.* 81(2):451-459.

IQBAL, M.; POOLE, E.; GOODBOURNE, S.; MCCAULEY, J.W. 2004. Role for Bovine Viral Diarrhea Virus E^{ms} Glycoprotein in the Control of Activation of Beta Interferon by Double-Stranded RNA. *J. Virol.* 78(1):136-145.

LAMBOT, M.; DOUART, A.; JORIS, E.; LETESSON, J-J.; PASTORET, P-P. 1997. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* 78(5):1041-1047.

LANGEDIJK, J.P.M. 2002. Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus E^{rns} and ribotoxin L3 loop. *J. Biol. Chem.* 277(7):5308-5314.

LANGEDIJK, J.P.M.; VAN VEELLEN, P.A.; SCHAAPER, W.M.M.; DE RU, A.H.; MELOEN, R.H.; HULST, M.M. 2002. A structural model of pestivirus E^{rns} based on disulfide bond connectivity and homology modeling reveals an extremely rare vicinal disulfide. *J. Virol.* 76(20):10383-10392.

LAZAR, C.; ZITZMANN, N.; DWEK, R.A.; BRANZA-NICHITA, N. 2003. The pestivirus E^{rns} glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology.* 314(2):696-705.

LIEBLER-TENORIO, E.M. 2005. Pathogenesis in: Goyal, S.M.; Ridpath, J.F. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis Management and Control*. Ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp 121-143.

MEYER, C.; VON FREYBURG, M.; ELBERS, K.; MEYERS, G. 2002. Recovery of Virulent and RNase-Negative Attenuated Type 2 Bovine Viral Diarrhea Viruses from Infectious cDNA Clones. *J. Virol.* 76(16):8494-8503.

MEYERS, G.; SAALMÜLLER, A.; BÜTTNER, M. 1999. Mutations Abrogating the RNase Activity in Glycoprotein E^{rns} of the Pestivirus Classical Swine Fever Virus Lead to Virus Attenuation. *J. Virol.* 73(12):10224-10235.

MEYERS, G.; EGE, A.; FETZER, C.; VON FREYBURG, M.; ELBERS, K.; CARR, V.; PRENTICE, H.; CHARLESTON, B.; SCHÜRMAN, E-M. 2007. Bovine viral diarrhea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting E^{ms} RNase and N^{pro} protease. *J. Virol.* 81(7):3327-3338.

MEYERS, G.; THIEL, H-J. 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 47(1):53-118.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. 1995. *Virus Taxonomy.* Springer-Verlag Wien New York. pp. 415-427.

ORTEGA, R. 2012. Análisis de las regiones genómicas 5' NCR, 3' NCR, E^{ms}, E2 y NS3 y su probable influencia en la eficiencia replicativa de un aislado nacional (CH511) de Virus Diarrea Viral Bovina. Tesis Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Vet. y Pec. 162 p.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TIJSSEN, P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology.* 203(2):260-268.

PIZARRO-LUCERO, J.; CELEDÓN, M-O.; AGUILERA, M.; DE CALISTO, A. 2006. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet. Microbiol.* 115(1-3):208-217.

PUCK, T.; CIECIURA, S.; ROBINSON, A. 1958. Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* 108(6):945-956.

REED, L.J.; MUENCH, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Epidemiol. 27(3):493-497.

REINHARDT, G. 1992. Diarrea viral bovina/enfermedad mucosa una enfermedad viral compleja. Monografías Med. Vet. 14(1):49-55.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R.; DUBOVI, E.J. 1994. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. Virology. 205(1):66-74.

RIDPATH, J.F. 2005. Classification and Molecular Biology In: Goyal, S.M.; Ridpath, J.F. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. Ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp. 65-80.

RUGGLI, N.; TRATSCHIN, J-D.; SCHWEIZER, M.; MCCULLOUGH, K.C.; HOFMANN, M.A.; SUMMERFIELD, A. 2003. Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of N^{pro}. J. Virol. 77(13):7645-7654.

RÜMENAPF, T.; UNGER, G.; STRAUSS, J.H.; THIEL, H-J. 1993. Processing of the envelope glycoproteins of pestivirus. J. Virol. 67(6):3288-3294.

SANTANA, C. 2013. Determinación de la eficiencia replicativa de aislados chilenos del Virus Diarrea Viral Bovina en células MDBK. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Vet. y Pec. 61 p.

SCHWEIZER, M.; PETERHANS, E. 2001. Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. J. Virol. 75(10):4692-4698.

TAUTZ, N.; ELBERS, K.; STOLL, D.; MEYERS, G.; THIEL, H-J. 1997. Serine protease of pestivirus: determination of cleavage sites. *J. Virol.* 71(7):5415-5422.

TRATSCHIN, J-D.; MOSER, C.; RUGGLI, N.; HOFMANN, M.A. 1998. Classical swine fever virus leader proteinase N^{pro} is not required for viral replication in cell culture. *J. Virol.* 72(9):7681-7684.

TEWS, B.A.; SCHÜRMAN, E-M.; MEYERS, G. 2009. Mutation of cysteine 171 of pestivirus E^{ns} RNase prevents homodimer formation and leads to attenuation of classical swine fever virus. *J. Virol.* 83(10):4823-4834.

TEWS, B.A.; MEYERS, G. 2007. The pestivirus glycoprotein E^{ns} is anchored in plane in the membrane via an amphipathic helix. *J. Biol. Chem.* 282(45):32730-32741.

VAN GENNIP, H.G.P.; HESSELINK, A.T.; MOORMANN, R.J.M.; HULST, M.M. 2005. Dimerisation of glycoprotein E^{ns} of classical swine fever virus is not essential for viral replication and infection. *Arch. Virol.* 150(11):2271-2286.

VON FREYBURG, M.; EGE, A.; SAALMÜLLER, A.; MEYERS, G. 2004. Comparison of the effects of rnsase-negative and wild-type classical swine fever virus on peripheral blood cells of infected pigs. *J. Gen Virol.* 85(7):1899-1908.

WEGELT, A.; REIMANN, I.; ZEMKE, J.; BEER, M. 2009. New insights into processing of bovine viral diarrhoea virus glycoproteins E^{ns} and E1. *J. Gen. Virol.* 90(10):2462-2467.

WEILAND, E.; AHL, R.; STARK, R.; WEILAND, F.; THIEL, H-J. 1992. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.* 66(6):3677-3682.

WEILAND, F.; WEILAND, E.; UNGER, G.; SAALMÜLLER, A.; THIEL, H-J. 1999. Localization of pestiviral envelope proteins E^{ms} and E2 at the cell surface and on isolated particles. J. Gen. Virol. 80(5):1157-1165.

WIDJOJOATMODJO, M.N.; VAN GENNIP, H.G.P.; BOUMA, A.; VAN RIJN, P.A.; MOORMANN, R.J.M. 2000. Classical swine fever virus E^{ms} deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines. J.Virol. 74(7):2973-2980.

WINDISCH, J.M.; SCHNEIDER, R.; STARK, R.; WEILAND, E.; MEYERS, G.; THIEL, H-J. 1996. RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. J. Virol. 70(1):352-358.

ANEXOS

Anexo 1: Resultados de actividad RNasa para los distintos controles y cepas del VDVB.

Cepa	Actividad RNasa
NADL	0,431
NADL	0,828
NADL	0,394
NADL	0,635
NADL	0,651
CH/113	0,904
CH/113	0,960
CH/113	0,691
CH/113	0,657
CH/1025	0,549
CH/1025	0,479
CH/1025	0,583
CH/1025	0,419
CH/1025	0,739
CH/1025	0,497
CH/1025	0,727
CH/511	-0,095
CH/511	-0,079
CH/511	-0,130
CH/511	-0,130

CH/511	-0,138
CH/511	-0,122
CH/1087	-0,089
CH/1087	-0,086
CH/1087	-0,104
CH/1087	-0,091
CH/1087	-0,134
CH/1087	-0,132
CH/1087	-0,130
CH/1087	-0,122
Células sin infectar	-0,093
Células sin infectar	-0,089
Células sin infectar	-0,138
Células sin infectar	-0,140
Células sin infectar	-0,133
Células sin infectar	-0,140

Anexo 2: Secuencias aminoacídicas de la región E^{ms} de aislados del VDVB (Ortega, 2012), donde se muestra la presencia de Tirosina (Y) en la posición 79 de la glicoproteína en los virus del subgenotipo 1j, a diferencia del resto de los aislados, que presentan Histidina (H) en dicha posición.

```

#E0NADL ENITQWNLQD NGTEGIQRAM FQRGVNRS LH GIWPEKICTG VPSHLATDIE LKTIHGMMDA SEKTNYTCCR LQRHEWNKHG
#E01091 ..... M. .... R.....
#E0916 ..... V.....
#E0921 ..... R.....
#E01068 ..... R.....
#E0113 ..... T. A.....
#E01025 ..... I..... T. A.....
#E0470 ..... T. A..... T.....
#E0KS86 .....
#E0511 .K.....
#E0_1087 ..... Y.....
#E0809 ...K...M... ..Q.. .L..... ..T...Y.. ..E.V.....

#E0NADL WCNWYNIEPW ILVMNRTQAN LTEGQPPREC AVTCRYDRAS DLNVVTQARD SPTPLTGCKK GKNFSFAGIL MRGPCNFEIA
#E01091 ..... I..... L..... D..... Q.....
#E0916 ..... I..... KD..... V..... T.....
#E0921 ..... I..... L..... D..... Q.....
#E01068 ..... I..... L..... D..... Q.....
#E0113 ..... G.. .L..K..... D..... I..... V..... A.....
#E01025 ..... L..K..... D..... V..... VQ.....
#E0470 ..... L..K..... D..... G..... V..... A.....
#E0KS86 ..... L..... D..... VQ..... VV
#E0511 ..... L..... D..... VQ..... VV
#E0_1087 ..... L..... DR..... VQ..... VV
#E0809 ...FH.... .WL..K..N.....L..... ..KVA E..I..... R..T..... ..L...VV LD.....KVS

#E0NADL ASDVLFKEHE RISMFQDTTL YLVDGLTNSL EGARQGTAKL TTWLGKQLGI LG
#E01091 ..... D CT.V...AH .....M.... .S.....
#E0916 ..... CTGV...AH .....M.... .S.....
#E0921 ..... D CT.V...AH .....M.... .S.....
#E01068 ..... D CT.V...AH .....M.... .S.....
#E0113 V..... D CT..I...AH .....V.... .S.....R.....
#E01025 V..... D CT..I...AH .....M.... .S.....R.....
#E0470 ..... L...D CT.VI...AH .....M.... .S.....R.....S...R.....
#E0KS86 ..... R..D CTNI...A.H .....M.G.. .S.....
#E0511 ..... R..D CTNI...A.H .....M.G.. .S.....
#E0_1087 ..... R..D CTNI...A.H .....M.G.. .S.....
#E0809 VE..... D CGN.L.E.VI Q.L..A..TI .....V.....RV ..

```