



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**DETERMINACION DE LA EFICIENCIA REPLICATIVA DE
VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA EN CELULAS MDBK
AISLADOS DE LLAMAS Y ALPACAS EN CHILE**

JOSE FRANCISCO QUETALPILLÁN NEIRA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: MARIA OFELIA CELEDON VENEGAS

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDECYT 1080130

**SANTIAGO, CHILE
2012**



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACION DE LA EFICIENCIA REPLICATIVA DE VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA EN CELULAS MDBK AISLADOS DE LLAMAS Y ALPACAS EN CHILE

JOSE FRANCISCO QUETALPILLÁN NEIRA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : MARÍA CELEDÓN VENEGAS
PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ PIZARRO L.
PROFESOR CONSEJERO: MARIANA ACUÑA

SANTIAGO, CHILE
2012

Esta memoria de título fue financiada por el proyecto **FONDECYT N° 1080130**: "Análisis genómico, antigénico y de virulencia de pestivirus obtenidos de rumiantes domésticos".

INDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
Generalidades del virus Diarrea Viral Bovina.....	5
Infección del Virus Diarrea Viral Bovina en ovinos y caprinos.....	8
Infección del virus diarrea viral bovina en camélidos sudamericanos.....	9
Consecuencias de la infección por el Virus Diarrea Viral Bovina en bovinos.....	10
Diagnóstico de la Diarrea Viral Bovina.....	15
Virus Diarrea Viral Bovina en Chile.....	17
Biotipos del Virus Diarrea Viral Bovina.....	19
Genotipos y subgrupos genómicos del Virus Diarrea Viral Bovina.....	20
Variación antigénica del Virus Diarrea Viral Bovina.....	22
Cuasiespecies del Virus Diarrea Viral Bovina.....	22
Multiplicación del Virus Diarrea Viral Bovina.....	23
Virulencia del Virus Diarrea Viral Bovina.....	26
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS.....	28
MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
Aislados virales.....	29
Cultivos celulares.....	30
Multiplicación de los aislados del Virus Diarrea Viral Bovina conservados a -80°C.	31
Determinación de viriones en los lisados celulares.....	32
Prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IPI).....	33
Determinación de la eficiencia de replicación de los aislados virales.....	34
Análisis de resultados.....	35
RESULTADOS Y DISCUSION.....	37
CONCLUSION.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	60
ANEXOS.....	78

RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es de distribución mundial y afecta a rumiantes domésticos como bovinos, ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos (CSA). En ganadería, produce grandes pérdidas económicas sobre todo por los problemas reproductivos que genera. El VDVB, presenta una gran diversidad genética que se traduce en variaciones en el comportamiento antigénico y patogénico, produciendo una diversidad de síndromes clínicos que se manifiestan, con mayor o menor intensidad, dependiendo de varios factores asociados al hospedador o al virus. Uno de los factores del virus, asociados a la severidad de los cuadros clínicos es la virulencia.

El objetivo de esta memoria de título fue conocer la eficiencia replicativa de aislados pertenecientes a distintos subgrupos genómicos del VDVB, obtenidos de CSA con diferentes manifestaciones clínicas, mediante la determinación de cinética de crecimiento viral en cultivos celulares. Para ello, se analizó diferentes variables de crecimiento viral utilizando 11 aislados de diferentes subgrupos genómicos (dos VDVB-1b, seis VDVB-1e y tres VDVB-2a).

Considerando las variables periodo de eclipse, producción máxima de viriones, liberación máxima de viriones y velocidad de crecimiento, los aislados del VDVB-1e resultaron ser significativamente más eficientes que los aislados de los subgrupos VDVB-1b y VDVB-2a. Este resultado sugiere que el genotipo VDVB-1e presenta una mayor virulencia, lo que se traduciría en cuadros clínicos de mayor consideración con respecto a los otros subgrupos analizados.

SUMMARY

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), has worldwide distribution and affects domestic ruminants like bovines, ovines, goats and South American Camelids (SAC). Produces great economic losses in cattle, mostly due to the reproductive problems that it generates. BVDV has a great genetic diversity which results in variations of the antigenicity and pathogenicity, producing a diversity of clinical syndromes that manifest with different severities that depend on various factors associated to the virus host and the virus itself. One of these virus factors associated to the severity of clinical signs is its virulence.

The purpose of this research was to find out the replicative efficiency of BVDV isolates of different genomic subgroups obtained from SAC with different clinical signs through the determination of viral growth kinetics in cell cultures. In order to do this, different growth variables were analyzed using 11 isolates from different genomic subgroups (two BVDV-1b, six BVDV-1e and three BVDV-2a).

Considering growth variables: eclipse period, maximum virion production, maximum virion release and growth velocity, we found BVDV-1e isolates significantly more efficient than BVDV-1b and BVDV-2a isolates. These results suggest that the BVDV-1e genotype is highly virulent, which would manifest in clinical signs of high severity compared to other analyzed genomic subgroups.

INTRODUCCION

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDBV) es un pestivirus de distribución mundial, y es el agente etiológico de una gran diversidad de cuadros clínicos que en forma general afectan directamente la capacidad reproductiva, así como también productiva, en el ganado bovino, generando finalmente grandes pérdidas económicas.

El VDVB además de infectar al ganado bovino también tiene la capacidad de infectar a otras especies tales como porcinos, ovinos, caprinos, algunos rumiantes silvestres y también a los camélidos sudamericanos. De estos últimos, son de importancia para nuestro país, las alpacas y las llamas, camélidos domésticos de los cuales se ha aislado el virus, que son fuente importante de una gran gama de recursos y además forman parte de la cultura de sectores de poblaciones indígenas de la zona norte de Chile.

El VDVB presenta una gran diversidad genética que se traduce en variaciones en el comportamiento antigénico y patogénico produciendo una diversidad de síndromes clínicos que se manifiestan con mayor o menor intensidad dependiendo de varios factores asociados al hospedador o al virus. Uno de los factores asociados al virus que hacen que las enfermedades se presenten en forma subclínica, moderada o grave es la virulencia, la que se define como la capacidad del virus para invadir los tejidos del hospedador, capacidad que está directamente relacionada con una mayor o menor replicación de partículas virales en las células del hospedador.

Hasta ahora, es discutido el rol patógeno del VDVB en los CSA. Bajo el conocimiento que uno de los factores de virulencia está determinado por la cantidad de virus producido y la velocidad de multiplicación viral in vitro, se plantea conocer y comparar estos parámetros en variantes genómicas de VDVB obtenidos de CSA ubicados en la Región Metropolitana.

REVISION BIBLIOGRAFICA

La Diarrea Viral Bovina (DVB) fue descrita por primera vez en 1946 por investigadores de la Universidad de Cornell, Estados Unidos, los cuales observaron una nueva enfermedad transmisible en terneros en granjas de Nueva York, caracterizada por leucopenia, fiebre alta, depresión, diarrea, deshidratación, anorexia, salivación, descarga nasal, erosiones en el aparato digestivo y hemorragias en diversos tejidos (Olafson *et al.*, 1946). Una enfermedad similar se describió en Canadá (Childs, 1946). Esta enfermedad, posteriormente denominada Enfermedad de las Mucosas (EM), producía en el tracto gastrointestinal lesiones mucho más intensas que la DVB, afectaba solo a algunos animales de la granja con una alta tasa de letalidad, pero al no conseguirse su transmisión experimental, se consideró como una enfermedad diferente a la DVB (Ramsey y Chivers, 1953), hasta que estudios utilizando neutralización vírica determinaron que la DVB y la EM eran diferentes manifestaciones de una misma enfermedad producidas por el mismo agente, el VDVB (Gillespie *et al.*, 1961; Kniazeff *et al.*, 1961; Thomson y Savan, 1963).

Generalidades del Virus Diarrea Viral Bovina

El VDVB pertenece al género *Pestivirus* y forma parte de la familia *Flaviviridae*, el cual contiene cuatro especies virales antigénicamente relacionadas: el VDVB genotipo 1 (VDVB-1) y genotipo 2 (VDVB-2) que infectan, mayormente, a bovinos, ovinos y caprinos, y a especies relacionadas dentro del orden Artiodactyla (Nettleton, 1990; Becher *et al.*, 1997; Ávalos Ramírez *et al.*,

2001; Evermann y Barrington, 2005), el virus de la Enfermedad de la Frontera (VEF) que infecta a ovinos y caprinos; y el virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC) que infecta a porcinos (Murphy *et al.*, 1999).

En general, los pestivirus son virus pequeños de alrededor de 30 a 40 nm de diámetro. Poseen una envoltura lipídica que deriva de las membranas de la célula infectada (Lindenbach *et al.*, 2007), y hace que estos virus sean susceptibles a la inactivación por solventes y detergentes (Ridpath, 2005). En la envoltura se ubican glicoproteínas virales que son fundamentales en el proceso de reconocimiento de células susceptibles de ser infectadas y en el estímulo de la respuesta inmune. Por debajo de la envoltura se dispone una cápside icosaédrica que cubre el genoma viral (Murphy *et al.*, 1999).

El genoma viral está constituido por una hebra única de ARN de polaridad positiva de alrededor de 12,5 Kb, con algo de variabilidad en el tamaño a consecuencia de las deleciones, inserciones y duplicaciones del genoma (Boulanger *et al.*, 1992). En los extremos 5' y 3' del ARN se ubican regiones no codificantes (NCR, del inglés “non codificant region”) altamente conservadas, de alrededor de 372 a 385 y de 185 a 273 nucleótidos, respectivamente (Murphy *et al.*, 1995; Vilček *et al.*, 1997; Lindenbach *et al.*, 2007). Las regiones NCR son requeridas para la síntesis de la hebra positiva del ARN, traducción y posiblemente empaquetado del genoma viral (Deng y Brock, 1993; Chon *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999; Becher *et al.*, 1999a; Becher *et al.*, 2000).

El marco de lectura abierto (ORF, del inglés “open reading frame”) codifica para una poliproteína de alrededor de 4.000 aminoácidos que es procesada por proteasas virales y celulares (Lindenbach *et al.*, 2007) generando 11 o 12

proteínas maduras en la secuencia N^{pro}-C-E^{ms}-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B. Las proteínas C-E^{ms}-E1-E2- son estructurales. C forma la nucleocápside viral, E^{ms} (cuya abreviación se refiere a “envelope ribonuclease soluble”) (Becher *et al.*, 1999b), es una proteína altamente glicosilada con actividad ribonucleasa, que induce la producción de niveles significativos de anticuerpos en el animal, pero con una limitada actividad neutralizante. E1, se encuentra covalentemente unida a E2 pero la inducción de anticuerpos neutralizantes es pobre. E2 es la proteína mayoritaria de la partícula viral y juega un rol preponderante en la respuesta inmune del hospedero, ya que posee los epítopes críticos en la estimulación de la producción de anticuerpos neutralizantes (Xue *et al.*, 1990; Horzineck, 1990; Boulanger *et al.*, 1992; Goens, 2002; Lindenbach *et al.*, 2007). Sin embargo, por ser traducida de una región altamente variable del genoma puede contribuir en la habilidad del VDVB para escapar a la respuesta inmune del hospedero (Ridpath, 2003). p7 es la proteína que sigue a las proteínas estructurales del virión; no está claro si es una proteína estructural o no estructural. De manera similar a la proteína p7 del virus de la hepatitis C (VHC), la proteína p7 de pestivirus podría formar canales de iones lo cual ha sido estudiado en un tipo de membranas sintéticas (black lipid membranes) (Pavlovic *et al.*, 2003), por lo que podría tener función en el ensamblaje y entrada del virus (Lindenbach *et al.*, 2007).

Las proteínas no estructurales N^{pro}-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B ocupan 2/3 de la información aportada por el ORF. N^{pro}, (cuya abreviación se refiere a “N-terminal autoprotease”) (Becher *et al.*, 1999b), corresponde a una proteasa no estructural, propia de los pestivirus, con actividad autocatalítica que

precede a la región que codifica para las proteínas estructurales del virus. NS2-3, en algunas cepas de pestivirus es cortada dando lugar a las proteínas NS2 y NS3 (Collett *et al.*, 1988), lo cual se utiliza como indicador de citopatogenicidad para el VDVB. La proteína NS2 ha sido descrita recientemente como una cisteína proteasa (Lindenbach *et al.*, 2007). La proteína NS3 posee actividad de serina proteasa (Méndez *et al.*, 1998; Ridpath, 2005), NTPasa y helicasa (Grassmann *et al.*, 1999), siendo responsable del efecto citopático del virus (Meyers *et al.*, 1992, Meyers y Thiel, 1996). NS4 y NS5, son procesadas generando NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. NS4A actúa como cofactor para la serina proteasa NS3 (Lindenbach *et al.*, 2007). Poco se sabe sobre la función de las demás proteínas y se postula que NS5B sería la polimerasa ARN-dependiente del virus (Meyers y Thiel, 1996; Lindenbach *et al.*, 2007).

Infección del Virus Diarrea Viral Bovina en ovinos y caprinos

En ovejas y cabras el VDVB produce un cuadro similar a la enfermedad de la frontera (EF) producida por el VEF, que es una enfermedad congénita de la oveja, de importancia económica. Los corderos que se infectan entre los 17 y 80 días de gestación con el VDVB o con el VEF pueden sufrir muerte, momificación y malformaciones. Los corderos recién nacidos presentan temblores musculares, malformaciones esqueléticas, retardo del crecimiento y un vellón anormal con características de pelo. Los corderos afectados son generalmente pequeños, débiles y de mala conformación, la espalda es corta y arqueada y la cabeza tiende a ser aguzada, algunos presentan dificultad para pararse con signos nerviosos de

contracciones musculares de los miembros anteriores y espalda, temblores musculares de la cabeza, orejas y cola, apoyo de la cabeza contra objetos, ceguera, nistagmos y anormalidades de la marcha. Estos signos pueden desaparecer con la edad, pero los corderos presentan una tasa de crecimiento menor, incluso muchos mueren antes del destete (Nettleton, 1990). La infección entre los 60 y 80 días de gestación puede originar el nacimiento de corderos persistentemente infectados (PI) (Nettleton, 1990) que pueden desarrollar un cuadro similar a la enfermedad de las mucosas cuando se reinfectan con un virus citopático (CP).

Infección del Virus Diarrea Viral Bovina en camélidos sudamericanos

En camélidos sudamericanos (CSA) la infección con el VDVB puede generar, anorexia parcial, letargo leve y diarrea ocasional (Carman *et al.*, 2005). Sin embargo, en necropsias de animales infectados con VDVB se ha observado emaciación, corneas nubladas, edema pulmonar, efusión de fluidos en cavidades corporales, linfadenopatía mesentérica, contenido intestinal líquido y hebras de fibrina en el saco pericardiaco (Belknap *et al.*, 2000; Mattson *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2007) y en hembras en gestación se han producido abortos y nacimientos prematuros (Goyal *et al.*, 2002; Wentz *et al.*, 2003; Carman *et al.*, 2005; Mattson *et al.*, 2006; Amstel y Kennedy, 2010). También se presentan nacimientos de animales PI, cuando la infección de la hembra ocurre en el primer tercio de la gestación (antes de los 140 días; si la ontogénesis del sistema inmune es proporcionalmente similar al de las vacas) (Mattson *et al.*, 2006; Byers *et al.*,

2010). En estos casos los signos incluyen poca ganancia de peso, diarrea crónica o intermitente, inflamación de articulaciones, episodios de descarga nasal, neumonía, anemia, bajos niveles sanguíneos de hemoglobina y leucopenia (Goyal *et al.*, 2002; Wentz *et al.*, 2003; Carman *et al.*, 2005; Mattson *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2007). Los signos pueden ocurrir a los pocos meses de edad y usualmente resultan en eutanasia o muerte del animal a una edad temprana (Amstel y Kennedy, 2010). El examen microscópico de los tejidos de una cría PI mostró necrosis de las células ganglionares en la retina del ojo y posible lisis de neuronas en secciones del cerebro y mediante tinción inmunohistoquímica se apreció antígenos de VDVB en estómago, riñón, glándula tiroidea, epitelio de la boca, piel y pabellón de la oreja (Carman *et al.*, 2005).

Consecuencias de la infección por el Virus Diarrea Viral Bovina en bovinos

El VDVB es uno de los agentes infecciosos causante de una enfermedad importante del ganado, que ha llevado a pérdidas económicas sustanciales en la industria lechera y de carne bovina a nivel mundial (Grooms, 2004). Se asocia con un complejo de enfermedades que afectan los sistemas reproductivos, respiratorio, gastrointestinal, circulatorio, inmunológico, linfático, músculo esquelético, tegumentario y nervioso central (Brock, 2004). Pero, las pérdidas reproductivas parecen ser la consecuencia económica más importante y existe evidencia que estas pérdidas han ido en aumento (Grooms, 2004).

La gran mayoría de los animales susceptibles inmunocompetentes se infectan con el VDVB entre los seis meses y los dos años de edad. El período de

incubación es de cinco a siete días, seguido por fiebre transitoria y leucopenia. En algunos casos la viremia persiste por 15 días y los anticuerpos neutralizantes son detectados después de dos a tres semanas post infección y probablemente persisten de por vida, pero, los individuos son susceptibles a reinfecciones (Baker, 1990), lo que explicaría en gran medida el alto porcentaje de seropositividad para el VDVB del ganado no vacunado (Bolin y Grooms, 2004).

La presentación clínica de una infección con VDVB puede tener varios desenlaces dependiendo de diferentes factores tales como edad, estado inmune, etapa reproductiva e infecciones concomitantes del hospedero, así como genotipo, biotipo y virulencia del virus (Liebler-Tenorio, 2005). Se describen las siguientes presentaciones

- a. Enfermedad subclínica: representa al 70% a 90% de las infecciones, se presenta con fiebre moderada y leucopenia en animales, generalmente, menores de dos años (Ames, 1986).
- b. Enfermedad clínica moderada: se presenta con fiebre, leucopenia, decaimiento, anorexia, descarga óculonasal y ocasionalmente lesiones orales caracterizadas por erosiones y ulceraciones superficiales oscuras. Un cuadro diarreico también puede estar presente y en ganado lechero la producción láctea tiende a disminuir (Ames, 1986).
- c. Síndrome hemorrágico: enfermedad clínica grave que surge en Estados Unidos a fines de la década de 1980 y es producida por cepas de genotipo VDVB-2. Cursa con trombocitopenia severa, diarrea hemorrágica, epistaxis, hemorragias en las superficies mucosas, sangramiento en los sitios de

inyección, hemorragia en la cámara anterior del ojo, fiebre, leucopenia y muerte (Ellis *et al.*, 1988; Corapi *et al.*, 1990; Bolin y Ridpath, 1992).

- d. Infección severa: enfermedad que se presentó en 1993 en Canadá que cursó en forma sobre aguda con fiebre, neumonía y muerte repentina en animales de todas las edades llegando a producir hasta un 25% de muertes en terneros (Carman *et al.*, 1998). El virus aislado también correspondió a VDVB-2 (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994).
- e. En ocasiones, también se han presentado brotes de enfermedad severa en que se ha aislado VDVB-1 con signos consistentes en diarrea, deshidratación rápida y muerte (Vilček *et al.*, 2001).
- f. Independiente del curso clínico, la infección con el VDVB es capaz de alterar la respuesta inmune del animal ya que ocasiona leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, aumentando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes. Tiene una fuerte afinidad por el tejido linforeticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos tejidos (Baker, 1990; Bolin y Grooms, 2004; Goyal, 2005).

Cuando la infección con el VDVB ocurre en una hembra en edad reproductiva la presentación de la enfermedad, generalmente, es subclínica, pero, el efecto del virus en el feto depende del tiempo de gestación de la hembra, desarrollo del sistema inmune del feto, biotipo de la cepa infectante y virulencia del virus (Duffel y Harkness, 1985; Brownlie, 1990; Grooms, 2004).

- a. Infección en periodo embrionario (9 a 45 días de gestación): puede generar un impacto en la eficiencia reproductiva del animal. Existe evidencia de una baja en la tasa de preñez en hembras con seroconversión, que se puede

deber a un daño directo del virus sobre el ovocito o indirecto a través de cambios histológicos tanto en el oviducto como en el útero, que alteran el medio provocando reducción en la viabilidad del concepto temprano o generando la muerte del embrión (Grooms, 2004; Brock *et al.*, 2005).

- b. Si la infección ocurre en etapa posterior a la embrionaria, entre los 45 y 125 días de gestación, el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria, causando vasculitis en el lado materno de la placenta y luego infectar al feto (Baker, 1990; Fredriksen *et al.*, 1999) provocando muerte fetal seguida de aborto o momificación. La expulsión del feto puede ocurrir varios meses después de la infección (Casaro *et al.*, 1971; Done *et al.*, 1980; Duffell y Harkness, 1985). La sobrevivencia del feto puede alterarse por defectos congénitos, pues involucra la etapa final de la organogénesis del sistema nervioso, como también la habilidad fetal de montar una respuesta inflamatoria. Las lesiones teratógenicas a nivel del sistema nervioso incluyen microencefalopatía, hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, hipomielinogenesis, defectos oculares como atrofia retinal, neuritis óptica, cataratas, microftalmia, displasia retinal. A nivel de sistema inmune puede provocar aplasia tímica, entre otras anomalías (Roeder *et al.*, 1986; Radostits y Littlejhons, 1988; Baker, 1990). Como la maduración de la respuesta inmune ocurre alrededor de los 125 días de gestación, los fetos que sobreviven a la infección con VDVB no citopatogénico (NCP) entre los 18 y 125 días de gestación invariablemente desarrollan inmunotolerancia al virus y subsecuentemente nacen como animales PI (Grooms, 2004). La

significancia del biotipo se evidencia claramente durante este periodo fetal, pues la infección con cualquier biotipo es capaz de causar pérdida fetal, pero sólo el biotipo NCP puede generar animales PI, que son el reservorio del virus en la población animal y susceptibles de sufrir la EM (Radostits y Littlejhons, 1988; Baker, 1990).

- c. Si la infección sucede después de los 150 días de gestación, en esta etapa el feto se encuentra inmunológicamente competente y raramente causa malformaciones congénitas. El ganado puede ser normal al nacimiento y tener anticuerpos neutralizantes para el VDVB, previo a la ingesta de calostro (Baker, 1990).

La EM solo ocurre en animales PI que sufren sobre infección con biotipos CP homólogos. Es una forma esporádica, fatal, de curso agudo o crónico y se caracteriza por severa leucopenia, erosiones y ulceraciones en el sistema digestivo (Ridpath, 2010). La replicación inicial del virus ocurre en las mucosas alrededor del sitio de entrada y es responsable de la ulceración de las mucosas y siguiente salivación o descarga nasal. Desde allí, el virus entra en el tejido linfoide que rodea la orofaringe, especialmente las células epiteliales de las criptas tonsilares donde el antígeno viral es encontrado durante la infección aguda. El virus parece ser capaz de multiplicarse en todas, o la mayoría, de las poblaciones de linfocitos así también como en células accesorias (Murphy *et al.*, 1999). La EM es de presentación esporádica y generalmente ocurre entre los seis y 24 meses de edad. Está caracterizada por producir baja morbilidad y alta letalidad (Murphy

et al., 1999). La manifestación clínica se presenta cuando un animal que se ha infectado en vida intrauterina con el VDVB NCP y está en la condición de PI, se sobreinfecta con una cepa del mismo tipo antigénico pero de biotipo CP. Los signos clínicos comprenden pirexia, anorexia, letargia, diarrea profusa con contenido de sangre fresca o coagulada, descarga nasal mucopurulenta y deshidratación. La muerte ocurre generalmente después de dos semanas de iniciados los signos clínicos. La lesión más evidente es ulceración extensiva del tracto gastrointestinal (Murphy *et al.*, 1999).

Diagnóstico de la Diarrea Viral Bovina

El diagnóstico de una enfermedad producida por VDVB basada en el historial del rebaño y los signos clínicos de la enfermedad, sólo puede ser considerado presuntivo debido a que diferentes manifestaciones son dependientes de la virulencia de la cepa viral, de la edad y estado inmune del animal afectado, del estado reproductivo del animal y de la presencia de otros patógenos concomitantes (Goyal, 2005). El diagnóstico de laboratorio se hace necesario cuando: el animal afectado muestra signos clínicos que hagan sospechar de la participación del virus, exista falla reproductiva en un rebaño, se quiere detectar animales PI para ser eliminados del rebaño, se quiere conocer la eficiencia de vacunas aplicadas a un rebaño, se necesita controlar la calidad de productos derivados de ganado, como por ejemplo suero fetal bovino, y cuando se requiere identificar el genotipo prevalente en un rebaño (Saliki y Dubovi, 2004).

Los métodos de laboratorio para identificar la participación del VDVB en los rebaños, se basan en la detección de antígenos o genomas virales en muestras clínicas, o bien, en la identificación de anticuerpos en el suero del animal producidos como respuesta posterior a la exposición al virus.

Clásicamente, el aislamiento viral en cultivos celulares es el método más confiable para la detección de infección por el VDVB, seguido por la identificación de antígenos virales a través del ensayo de inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa y ELISA o del genoma viral por prueba de transcriptasa inversa Reacción en Cadena de las Polimerasa (RT-PCR.) Durante periodos de viremia, el virus puede ser aislado desde descarga nasal, pulmones, heces, semen, tejidos de fetos y sangre, sin embargo, la presencia de anticuerpos anti-VDVB pueden interferir con el aislamiento viral en las muestras de sangre (Goyal, 2005). Los mismos procedimientos pueden aplicarse directamente en las muestras clínicas (sin requerir del aislamiento viral), pero en muchos casos la no amplificación del virus puede entregar resultados falsos negativos. Se considera que la RT-PCR es un método que supera las deficiencias antes señaladas debido a que posee alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico y además la presencia de anticuerpos en las muestras no interfieren con el diagnóstico, de tal modo que es la prueba más utilizada para escaneo de rebaños mediante muestras de sangre (Amstel y Kennedy, 2010).

Para la identificación y cuantificación de anticuerpos en el suero se emplea, mayoritariamente, la prueba de seroneutralización, que es considerada como el estándar de oro para medir anticuerpos. Solo un aumento del título de anticuerpos mayor o igual a cuatro diluciones en muestras de sangre obtenidas en la fase

aguda y convalecencia dan cuenta de una infección reciente (Amstel y Kennedy, 2010).

Virus Diarrea Viral Bovina en Chile

En Chile se empieza a sospechar de la presencia de DVB/EM entre los años 1983 y 1984, basado en hallazgos anatomopatológicos (Fiedler *et al.*, 1986). Esto, posteriormente se confirmó en 1985, cuando se aisló el virus a partir de un brote de EM que afectó a terneros en la zona sur del país (Reinhardt *et al.*, 1986). Posteriormente, el virus se ha aislado en numerosas ocasiones de bovinos sanos y enfermos como también de fetos abortados (Celedón *et al.*, 1997a) y de bovinos persistentemente infectados (Celedón *et al.*, 1998).

Estudios serológicos muestran una amplia diseminación del virus en el país. Prevalencias serológicas demuestran valores de 69,2% para bovinos de la región de la Araucanía y la región de los Lagos (Reinhardt *et al.*, 1990) y de 60% en bovinos de leche (Celedón *et al.*, 1996) y 86% en bovinos de carne de la Región Metropolitana de Santiago (Celedón *et al.*, 1997b).

A nivel nacional se ha podido determinar mediante el uso de RT-PCR y enzimas de restricción, la existencia de aislados de VDVB pertenecientes a los genotipos VDVB-1 y VDVB-2, los subgrupos 1a, 1b y 1c (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006). En el análisis de cuatro aislados, dos VDVB-1 y dos VDVB-2, se observó que todos eran NCP, que no había diferencias en la eficiencia de productividad viral obtenida en cultivos primarios de células de pulmón, riñón, cornete nasal y

testículo de bovino, pero antigénicamente no eran exactamente iguales (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

En ovinos de la Región de Los Lagos, se han detectado animales seropositivos para pestivirus (Riedemann *et al.*, 1991) con una prevalencia serológica promedio de 8,5% (Tadich *et al.*, 1998), en tanto que se detectó reaccionantes en 60/321 (19%) de las muestras de sueros procedentes de ovinos de las Regiones Metropolitana y de Magallanes y Antártica Chilena) (Celedón *et al.*, 2001), a la vez que se obtuvo 12 aislados procedentes de las Regiones de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo, de Magallanes y Antártica Chilena, y Metropolitana, que fueron identificados como VDVB genotipo 1 (Müller, 2003) subgrupo e (Beamin, 2009).

En caprinos se ha detectado seropositividad para el VDVB en 21/322 (6,5%) sueros analizados procedentes de la IV Región de Coquimbo y Región Metropolitana de Santiago (Celedón *et al.*, 2001) y se han obtenido 11 aislados procedentes de las Regiones de Coquimbo y Metropolitana de Santiago, que fueron identificados como VDVB genotipo 1 (Müller, 2003) subgrupo e (Beamin 2009).

En CSD se ha detectado seropositividad para el VDVB en 8/74 (11%) de alpacas y en 6/43 (14%) de llamas ubicadas en diferentes rebaños de la Región Metropolitana (Celedón *et al.*, 2001). Desde cinco llamas sin signos de estar enfermas, dos que abortaron y una muerta se ha aislado VDVB-2. En alpacas, en tres y cuatro clínicamente sanas se aisló VDVB-2 y VDVB-1, respectivamente, y en dos que abortaron se aisló VDVB-1 (Celedón *et al.*, 2006). Todos los aislamientos se han obtenido de alpacas y llamas que se encontraban ubicadas en

diferentes rebaños en la Región Metropolitana de Santiago y en contacto con ganado doméstico. No se han pesquisado animales con anticuerpos para el VDVB en alpacas y llamas de la Región de Arica y Parinacota (Fuentes, 2007), en guanacos de la Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo ni en vicuñas de la Región de Arica y Parinacota (Celedón *et al.*, 2001).

Por otra parte, se tiene el antecedente que en un rebaño de 200 llamas y alpacas de la Región Metropolitana de Santiago, de 41 hembras preñadas se produjo abortos en 14 hembras y de ellas 9 murieron después de que cursaran con signos respiratorios y/o digestivos, y 15 parieron crías vivas (Miranda, 2000). De los animales sobrevivientes se obtuvo muestras de sangre y de algunos se pudo aislar el VDVB-1, a la vez que en otros se pudo constatar altos títulos de anticuerpos para antígenos de VDVB y en tres se aisló el virus en dos ocasiones separadas por más de 30 días, en ausencia de respuesta inmune, constatándose la existencia de animales PI (Arce, 2001).

Biotipos del Virus Diarrea Viral Bovina

La mayoría de los aislados virales obtenidos de muestras clínicas que son sometidos a multiplicarse en células cultivadas *in vitro*, generan progenie viral sin provocar la destrucción de la célula, caracterizándose a estos aislados virales como NCP, pero, en ocasiones virus NCP evolucionan provocando vacuolización, redondeamiento y finalmente lisis de las células del cultivo celular generando virus CP (Lee y Gillespie, 1957; Gillespie *et al.*, 1960; Meyers y Thiel, 1996). El cambio de virus NCP a virus CP se asocia con la escisión de la proteína NS2-3 en las

proteínas NS2 y NS3, que puede ocurrir por inserción de secuencias que forman sitios de ruptura, por inserción de secuencias con actividad auto catalítica, o por cambios de conformación con generación de señal para las proteasas celulares (Meyers y Thiel, 1996; Hietala y Crossley, 2005). El evento de mutación más frecuentemente observado es la recombinación, en la cual pedazos cortos de genoma, de otro virus o de la célula hospedera, se insertan en el genoma de una cepa VDVB NCP (Becker, 2000). No todos los eventos de recombinación son asociados con el cambio de biotipo ya que algunos virus NCP tienen inserciones (Ridpath y Bolin, 1995; Ridpath *et al.*, 2006) y algunos virus CP no tienen estas inserciones (Quadros *et al.*, 2006).

Genotipos y subgrupos genómicos del Virus Diarrea Viral Bovina

La falta de capacidad de corrección de errores de la polimerasa viral dependiente de RNA, en la síntesis del genoma del VDVB, genera mutaciones puntuales que ocurren aproximadamente una vez cada 10 kb, y es equivalente a una o más mutaciones por ciclo de replicación, lo que explica la existencia de variantes genéticas del VDVB (Becher *et al.*, 1999a; Jones *et al.*, 2002). El análisis de la secuencia nucleotídica de secciones del genoma de aislados de VDVB ha detectado diferencias, lo que ha llevado a construir árboles filogenéticos que permiten clasificar al VDVB en dos genotipos, VDVB-1 y VDVB-2 (hoy aceptadas como especies virales) y subgrupos genómicos dentro de cada genotipo (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Ridpath y Bolin, 1995; Ridpath, 2010; Ridpath *et al.*, 2010). Para el VDVB-1 se describen los subgrupos genómicos VDVB-1a,

VDVB-1b, VDVB-1c, etc. hasta VDVB-1o y en VDVB-2 los subgrupos genómicos BVDV-2a y BVDV-2b. (Pellerin *et al.*, 1994; Vilček *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2002; Ridpath *et al.*, 2010). Diferentes subgrupos genómicos de VDVB predominan en diferentes localizaciones geográficas (Pellerin *et al.*, 1994; Kabongo *et al.*, 2003; Bachofen *et al.*, 2008; Ståhl *et al.*, 2009).

Además de los dos genotipos descritos, se han aislado otras variantes genómicas de pestivirus y se ha propuesto incluir un VDVB genotipo 3 (VDVB-3) (Liu *et al.*, 2009), que corresponde a un virus obtenido de un lote de suero fetal bovino contaminado de Brasil, un virus obtenido de un bovino infectado naturalmente en Brasil (Schirrmeyer *et al.*, 2004), un virus obtenido de búfalo en Brasil (Stalder *et al.*, 2005) y a un virus obtenido del suero de un ternero en Tailandia (Ståhl *et al.*, 2007). Otros pestivirus aún no identificados como VDVB ni ubicados dentro de las otras especies de pestivirus, por su escaso parentesco genómico, comprende a virus obtenidos de jirafa (*Giraffa camelopardalis*) (Harasawa *et al.*, 2000); de ovejas de Tunes y de lotes de vacunas viruela ovina contaminadas (Thabti *et al.* 2005); de un antílope (*Antilocapra americana*) en Estados Unidos (Vilček *et al.*, 2005); de un cerdo con síndrome de miocarditis en Australia (virus Bungowannah) (Kirkland *et al.*, 2007), de un reno (*Rangifer tarandus*) (Avalos-Ramírez *et al.*, 2001), de un bisón (*Bison bonasus*) (Becher *et al.*, 1999b) y de un ante (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) (Arnal *et al.*, 2004), entre otros.

Variación antigénica del Virus Diarrea Viral Bovina

Los genotipos VDVB-1 y VDVB-2 presentan marcadas diferencias antigénicas (Ridpath *et al.*, 2000; Ridpadth *et al.*, 2010) evidenciadas por la falla de las vacunas y de los diagnósticos basados en cepas VDVB-1 para controlar y detectar cepas VDVB-2 (Deregt, 2005), por los diferentes patrones de unión de anticuerpos monoclonales (Ridpath, *et al.*, 1994; Bolin y Ridpath, 1998), por los títulos de anticuerpos neutralizantes (Bolin y Ridpath, 1998) y por la respuesta de animales PI a la vacunación (Fulton *et al.*, 2003). No se sabe, sin embargo, si las variaciones en los subgrupos genómicos son suficientes para tener un impacto en la detección o la protección dada por la vacunación.

Cuasiespecies del Virus Diarrea Viral Bovina

Debido a que la mutación es un evento frecuente en los pestivirus, una población de VDVB no representa un clon homólogo, sino una “nube de mutantes,” relacionada y agrupada alrededor de la secuencia viral más frecuente, que son identificadas como cuasiespecies (Moya *et al.*, 2000; Hietala y Crossley, 2005). La existencia de cuasiespecies de VDVB refleja los altos índices de replicación del virus, así como también, la falta de capacidad de corrección de errores de la polimerasa viral dependiente de RNA y tendría como función evitar en forma efectiva la respuesta inmune en el hospedero infectado (Bolin *et al.*, 1991). Cuasiespecies de VDVB han sido recuperadas de ganado PI (Becher *et*

al., 1999a; Jones *et al.*, 2002), aunque estudios han reportado estabilización aparente del genoma en infecciones persistentes (Edwards *et al.*, 1991; Edwards y Paton, 1995; Hamers *et al.*, 1998; Hamers *et al.*, 2001). La estabilización del carácter antigénico, y no genético del virus, es consistente con la teoría de la eliminación inmunológica de variantes del VDVB en animales PI. La estabilización o falta de cambio genético significativo en el genoma del VDVB aislado de ganado PI a través del tiempo es también consistente con las observaciones de cepas rebaño-específicas de VDVB (Paton *et al.*, 1995).

Multiplicación del Virus Diarrea Viral Bovina

El proceso de multiplicación del VDVB se inicia con el reconocimiento de moléculas que están incluidas o íntimamente asociadas con la membrana citoplasmática de la célula hospedera. Se describe a una lipoproteína de baja densidad, que se repite múltiples veces en la superficie celular, como único receptor para la glicoproteína E2 del VDVB y que también facilita la endocitosis de la partícula viral (Hietala y Crossley, 2005). Por parte del virus, las glicoproteínas de la envoltura E^{ms} y E2, pueden unirse independientemente a diferentes moléculas de la superficie celular. Al parecer, E^{ms} se uniría a glicosaminoglicanos de la superficie celular y sería el evento inicial en la adsorción (Ridpath, 2010), pero, la habilidad del VDVB de infectar un rango relativamente diverso de tipos celulares, así como también el tropismo por los tejidos y especies hospederas están determinados por la glicoproteína E2 (Hietala y Crossley, 2005).

La internalización de la partícula viral se produce por endocitosis y el RNA genómico es liberado en el citoplasma, posterior a la acidificación de la vesícula endosomal (Hietala y Crossley, 2005). El RNA genómico actúa directamente como RNA mensajero para la traducción de proteínas virales y como plantilla para generar genomas de progenie. Al parecer, la replicación ocurre en el lado citoplasmático del retículo endoplasmático (Zhang *et al.*, 2003) y se requiere de factores celulares para completar los procesos (Hietala y Crossley, 2005).

El inicio de la traducción del genoma es de tipo Cap-independiente y es mediado por una secuencia nucleotídica conocida como IRES (del inglés, Internal Ribosome Entry Site), que se ubica en el extremo 5' UTR del genoma y permite comenzar la traducción del RNA mensajero uniéndose a la subunidad ribosomal 40S, dando lugar a la producción de proteínas no estructurales y estructurales (Hietala y Crossley, 2005).

Las proteínas virales no estructurales se ensamblan en un complejo funcional de replicación y sirven, en parte, para catalizar la síntesis de una hebra RNA complementaria de sentido negativo. El RNA de sentido negativo provee plantillas para sintetizar nuevas moléculas de RNA sentido positivo, usando un modelo de replicación asimétrico semiconservativo. El modelo incluye tres tipos de RNA virales, una forma replicativa de dos hebras, una hebra parcialmente simple y parcialmente doble y un RNA viral de una hebra. El cambio de la función del RNA, de un ciclo de traducción a replicación, se debe a la participación de estructuras y funciones de la región 5'UTR, incluyendo sitios del IRES; a la acumulación de proteínas virales, como NS5A y NS5B que pueden inhibir la traducción dependiente de IRES; a la participación de proteínas regulatorias que

interactúan con el genoma viral fuera de las IRES; a la interacción entre los complejos proteicos de traducción del virus y de la célula y a la competencia por la replicasa y el ribosoma (Yu *et al.*, 2000; Li y McNally, 2001; Ridpath, 2010).

Las proteínas virales son procesadas por proteasas virales y celulares para generar proteínas virales maduras. Las proteínas de la cápside son liberadas de la membrana del retículo endoplásmico e interactúan con RNA genómico seguido por el reconocimiento de dominios citoplasmáticos de proteínas de la envoltura. Los viriones parecen madurar en vesículas intracelulares en el aparato de Golgi o en el retículo endoplásmico, donde la envoltura lipídica es adquirida a través de la salida en el lumen vesical. La maduración del virus, incluyendo la estabilización de la conformación a través del doblado de la glicoproteína de E1-E2 y el transporte asociado a las superficie celular, es mediado por las enzimas y procesos de las células del hospedero (Branza-Nichita *et al.*, 2001). Los viriones intactos son liberados por gemación hacia la cisterna del retículo endoplásmico (Bielefeldt-Ohmann y Block, 1982; Gray y Nettleton, 1987; Grummer *et al.*, 2001), seguido por exocitosis con la detección de virus extracelular tan temprano como 8 horas post infección (Nuttall, 1980; Ridpath, 2010).

En modelos de cultivo celular, la replicación de VDVB ha sido detectada dentro de 4-6 horas después de la infección, con títulos máximos a las 12-24 horas post infección (Purchio *et al.*, 1983; Gong *et al.*, 1996).

Virulencia del Virus Diarrea Viral Bovina

La virulencia se refiere a una medida cuantitativa de la capacidad de un agente biológico para causar enfermedad, y está determinada por la capacidad para multiplicarse, ser invasivo, infectar células susceptibles, evadir el sistema inmune y causar daño en el tejido. De este modo, los virus que se replican de manera eficiente en el hospedero son más virulentos que los virus que se replican con menor eficiencia, y de hecho en muchos casos la replicación es un factor determinante de la severidad de la enfermedad (Bolin y Ridpath, 1992).

Algunos aislados de campo del VDVB-2 son más virulentos que otros, y que los VDVB-1, además, aislados dentro de un mismo genotipo presentan diferentes grados de virulencia (Carman, 1995; Ridpath *et al.*, 2000; Liebler-Tenorio *et al.*, 2002; Kelling *et al.*, 2002). Si bien hay una variación en la virulencia de las cepas de VDVB, hay poca información disponible en la literatura (Ridpath *et al.*, 2007). 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 mayor virulencia cursa con un cuadro clínico que en algunos casos puede ser mortal (Baker, 1990; Corapi *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1994). Se ha demostrado, mediante inoculaciones experimentales en terneros, que aislados de baja virulencia, generan cuadros clínicos consistentes en fiebre pasajera y linfopenia de hasta un 50% y el virus es detectable sólo en tejido linfoide, mientras que, aislados de alta virulencia generan fiebre alta y sostenida, diarrea persistente, linfopenia sobre 80%, trombocitopenia de 60 a 80% y el virus es detectable en tejido linfoide, adrenal, páncreas, estómago, intestino, hígado,

riñón, testículo, tiroides, pituitaria y piel (Kelling et al., 2002; Liebler Tenorio *et al.*, 2002; Liebler Tenorio *et al.*, 2003), demostrando que la diferencia de virulencia entre cepas de VDVB se asocia con la cantidad de virus presente en los tejidos y en la velocidad de diseminación del virus, atribuyéndose gran importancia a las diferencias en las propiedades de la multiplicación de las diferentes cepas virales (Bolin y Ridpath, 1992; Liebler Tenorio *et al.*, 2003).

En los Estados Unidos las cepas de VDVB-2 de baja virulencia han sido seleccionadas para su uso en vacunas modificadas (Fulton *et al.*, 2003) y las de alta virulencia se emplean, como cepas de desafío, para evaluar la eficacia de la protección inducida por la vacunación (Cortese *et al.*, 1998; Fairbanks *et al.*, 2003).

Estudios realizados, en cultivos celulares, con aislados de distinta virulencia de virus peste porcina clásica (VPPC), han demostrado diferencias en la liberación de las partículas virales de la progenie desde la célula infectada, donde las cepas más virulentas presentan una razón mayor de viriones libres (extracelular) / viriones asociados a células (intracelular), que cepas menos virulentas (Mittelholzer *et al.*, 2000).

Habiéndose obtenido VDVB identificado genómicamente como VDVB-1b, VDVB-1e y VDVB-2a, de alpacas y llamas de Chile sin antecedentes clínicos de haber sufrido enfermedad y de animales enfermos y muertos, surge la necesidad de conocer la potencial virulencia de algunos aislados a través de la determinación de la cinética de crecimiento viral en cultivos celulares.

HIPÓTESIS

Existen diferencias en la eficiencia de replicación de aislados de Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) obtenidos de alpacas y llamas en Chile.

OBJETIVOS

General

Contribuir al conocimiento de la virulencia del VDVB que infecta a camélidos sudamericanos domésticos en Chile.

Específicos

- Determinar la velocidad de multiplicación de aislados de VDVB-1b, VDVB-1e y VDVB-2a obtenidos de alpacas y llamas en Chile.
- Determinar la producción total de viriones de aislados de VDVB-1b, VDVB-1e y VDVB-2a obtenidos de alpacas y llamas en Chile.
- Establecer si hay diferencias en la velocidad de crecimiento y producción de viriones de VDVB-1b, VDVB-1e y VDVB-2a obtenidos de alpacas y llamas en Chile.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislados virales

Se trabajó con 11 aislados de VDVB obtenidos de camélidos sudamericanos (alpacas y llamas), entre los años 1998 y 2002, ubicados en la Región Metropolitana. Los aislados virales se encontraban almacenados a -80°C en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los antecedentes obtenidos indican que los aislados virales provenían de animales sanos, tanto de rebaños sin antecedentes que hiciera sospechar de la participación de un pestivirus, como de rebaños que presentaban altas tasas de abortos, muertes perinatales y muerte de animales adultos, en que no se diagnosticó la participación de otro agente infeccioso (Cuadro N° 1).

De los aislados seleccionados, ocho de ellos pertenecen al genotipo 1 del VDVB y los tres restantes, al genotipo 2. De los aislados pertenecientes al genotipo 1, dos corresponden al subgrupo 1b y seis corresponden al subgrupo 1e. Por último, de los aislados pertenecientes al genotipo 2, la totalidad corresponde al subgrupo 2a. Estos genotipos y subgrupos utilizados fueron determinados mediante estudios de filogenia molecular basada en una fracción del gen de la proteína E2 (Beamín, 2009).

Cuadro N° 1.

Antecedentes de los aislados de Virus Diarrea Viral Bovina obtenidos de alpacas (A) y llamas (LL)

Identificación del aislado	Año de obtención	Comuna de origen	Sexo	Edad	Genotipo y subgrupo
A 390****	1998	Colina	hembra	>10 años	1b
A 474****	1998	Colina	hembra	>4 años	1b
A 2*	1998	La Pintana	hembra	8 años	1e
A 290****	1998	Colina	hembra	3 años	1e
A 502****	1998	Colina	Macho	Cría	1e
LL 827**	1999	Maipú	hembra	4 años	1e
LL 1087***	2000	La Pintana	Macho	Adulto	1e
LL 1723***	2002	La Pintana	Macho	Adulto	1e
A 27*	1998	La Pintana	hembra	>4 años	2a
LL 626*	1999	La Pintana	S/A	Adulto	2a
LL 794**	1999	Maipú	hembra	4 años	2a

S/A: Sin Antecedentes; *: rebaño sin antecedentes clínicos; **: rebaño con abortos; ***: rebaño con partos prematuros y muertes súbitas de adultos; ****: rebaño con enfermedad respiratoria, digestiva, abortos, mortinatos y muertes de animales adultos.

Cultivos celulares

Para la multiplicación de los virus, se utilizaron monocapas de la línea celular Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) – adquiridas en el American Type Culture Collection, certificadas como libres de contaminación con el VDVB, lo cual fue comprobado por prueba de inmunofluorescencia directa e inmunoperoxidasa

indirecta en el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La línea celular fue mantenida mediante subcultivos, efectuados según procedimiento estándar (Edwards, 1990), y controlada periódicamente su condición de libre infección de VDVB, que se realizaron cada cuatro a cinco días, en botellas de vidrio de 10 ml en una concentración de 100.000 células por ml de medio de cultivo MEM: Medio Esencial Mínimo, Cat. N° 41500-067 (GIBCO®, BRL), suplementado con tampón HEPES, 5,95 gr/l Cat. N° 11344-041 (GIBCO®, BRL); estreptomicina, 100µg/ml, penicilina, 100 UI/ml (Combiótico®); anfotericina B, 2,5 µg/ml (Fungizona®); piruvato de sodio, 1mM, Cat. N° 11360-070 (GIBCO®, BRL) y bicarbonato de sodio, 1,5 gr/l, adicionado con suero equino (5%) proveniente del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

Multiplicación de los aislados del Virus Diarrea Viral Bovina conservados a -80°C

Para la multiplicación de cada aislado viral se emplearon monocapas de células MDBK de 50 cm² cultivadas con 24 horas de antelación las que, una vez descartado el medio de cultivo y lavadas con solución salina A de Puck (Puck *et al.*, 1961) a 37°C, fueron inoculadas con 200µl de cada virus. El inóculo viral se dejó adsorber por 60 minutos incubando a 37°C en ambiente húmedo con 5% de CO₂, y se repuso el medio de cultivo MEM suplementado con 2,5% de suero equino y se dejó incubar por 72 horas en las mismas condiciones. Posteriormente, con el fin de recuperar el virus intracelular, las células se lisaron realizando 3

ciclos de congelación y descongelación. Los restos celulares de mayor tamaño fueron descartados centrifugando el lisado a 3.000 x g por 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se tituló y conservó en alícuotas de 1 ml a -80°C.

Determinación de viriones en los lisados celulares

Para determinar la cantidad de virus infecciosos en los lisados celulares se emplearon microplacas de 96 pocillos (NUNC[®]), en las cuales 24 horas antes se sembró aproximadamente 15.000 células, contenidas en 100 µl de MEM adicionado de un 8% de suero equino, por cada pocillo. De cada aislado viral se realizaron diluciones seriadas en base 10, desde 1/10 a 1/10⁶ en MEM, y se inoculó 50 µl de cada dilución en cuatro pocillos, a los que previamente se les había retirado el MEM de las monocapas celulares. Después de incubar por 60 minutos en ambiente húmedo a 37°C con 5% de CO₂, se repuso el MEM adicionado de un 2% de suero equino y se incubó por un periodo de 72 horas en las mismas condiciones. En ausencia de efecto citopático, la presencia de virus en las células se verificó aplicando la prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IPI) y el título viral se determinó por el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938) que representa el valor recíproco de la dilución viral que infecta el 50% de los cultivos inoculados, y se expresa en dosis infectante cultivo de tejido 50% (DICT₅₀).

Prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta (IPI)

Las monocapas de células crecidas en microplacas, infectadas con las distintas diluciones virales y después de un periodo de incubación de 72 horas fueron lavadas con 100 µl de solución tampón fosfato 0,01M, pH 7,6 (PBS 7,6) por cinco minutos, luego fueron fijadas con 200µl de acetona al 20% en PBS 7,6 por un periodo de 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se retiró la acetona y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, las monocapas celulares fijadas en las microplacas, fueron incubadas por 10 minutos con 50 µl de una solución de lavado (0,9 ml Tween 80 25%/400 ml de PBS 7,6). Luego, se retiró la solución de lavado y se adicionó 50 µl de una mezcla de cuatro anticuerpos monoclonales de ratón (WB103, WB112, WB166, WB214), dirigidos contra epitopos de la glicoproteína de la envoltura E2 y contra la proteína no estructural NS2-3, ambas comunes para todos los pestivirus (Veterinary Laboratories Agency, UK) dejando incubar por 60 minutos a temperatura ambiente.

Posterior al periodo de incubación, se realizaron dos lavados de cinco minutos cada uno con 50 µl de solución de lavado. Se adicionó 50 µl de inmunoglobulina de cabra anti IgG de ratón (Goat anti-mouse IgG (H+L) conjugada con la enzima peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase (HRP) G21040, Invitrogen®) y se mantuvo en incubación por otros 60 minutos. Se repitieron los dos lavados de cinco minutos cada uno y se adicionó 50µl de una mezcla de DAB (3,3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma-Aldrich®) 0,6mg/ml en presencia de perborato de sodio tetrahidratado (BNaO3.4H2O,

Fluka®) 0,4mg/ml en PBS 7,6. Las microplacas se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente hasta su posterior observación en un microscopio invertido marca Nikon®, modelo Eclipse TS-100, (Laboratorio de Virología. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Chile), con aumento de 100x y 400x. Paralelamente, se efectuaron controles negativos y positivos, consistentes en aplicar la prueba de inmunoperoxidasa indirecta sobre células no infectadas (control negativo) y sobre células infectadas con VDVB (control positivo). La presencia de antígenos virales en las monocapas celulares se hizo evidente debido a que en ellas se formó un producto insoluble de color marrón que se visualizó microscópicamente en el citoplasma celular, otorgándole a aquellos pocillos la condición de positivos. Según este criterio, los pocillos con monocapas ausentes de coloración citoplasmática fueron consideradas negativos.

Determinación de la eficiencia de replicación de los aislados virales

Para determinar la eficiencia de replicación de los aislados virales se empleó como referencia el modelo empleado en estudios de virulencia del VPPC (Mittelholzer *et al.*, 2000), midiendo la producción de viriones extracelular a diferentes tiempos de incubación.

Para tal efecto, se utilizó microplacas de 24 pocillos (NUNC®) que se sembraron con 150.000 células MDBK contenidas en un ml de MEM de crecimiento por cada pocillo. A las 24 horas de incubación a 37° C con 5% de CO₂, se retiró el MEM de crecimiento y se inoculó 75.000 DICT₅₀ de cada aislado viral

en 80 pocillos, permitiendo la adsorción del virus por 60 minutos a 4°C. Posteriormente, se retiró el remanente del inóculo y con la finalidad de retirar al máximo las partículas virales no adsorbidas, se realizó tres lavados con solución salina A de Puck a 37° C. Luego, se repuso 1.000 µl de MEM de mantención para posteriormente incubar a 37° C con 5% de CO₂ y realizar cosechas del medio sobrenadante en tiempos definidos.

En los tiempos 3-6-9-12-15-18-21-24-30 y 36 horas de incubación se cosechó el MEM sobrenadante de ocho pocillos de cada aislado viral. Cada uno de los sobrenadantes fue clarificado centrifugando a 3.000 x g por cinco minutos a 4 °C, a fin de eliminar las células infectadas que se hubiesen desprendido de la monocapa celular. El sobrenadante celular clarificado se almacenó a -80° C hasta el momento de ser titulada la infecciosidad viral de cada alícuota. Paralelamente, se controló la condición de células libres de contaminación con VDVB, mediante la aplicación de la prueba de inmunoperoxidasa indirecta sobre células no infectadas con VDVB.

Análisis de resultados

La producción de viriones en cada tiempo, se obtuvo del promedio de las mediciones de la infecciosidad viral medida en los ocho pocillos.

Con los valores promedios para cada aislado viral se determinaron las variables:

Periodo de eclipse: corresponde al tiempo transcurrido desde el final del periodo de adsorción (tiempo 0) hasta el tiempo previo al ascenso en el título viral.

Virus residual: corresponde a virus no adsorbido y no eliminado en el proceso de lavado de las monocapas.

Periodo de producción máxima de viriones: corresponde al tiempo transcurrido desde el fin del periodo de adsorción (tiempo 0) hasta el tiempo de la producción máxima de viriones.

Producción máxima de viriones: corresponde al mayor título de virus obtenido en el periodo de producción de viriones.

Periodo de liberación de viriones: corresponde al tiempo transcurrido desde el inicio de la producción de viriones hasta el tiempo del título máximo logrado.

Liberación máxima de viriones: corresponde a la diferencia entre el título de la producción máxima de viriones y el título de virus residual

Velocidad de multiplicación: corresponde al cociente entre la producción máxima de viriones expresada en dosis infectante $DICT_{50}$ y el periodo de la producción máxima de viriones.

Para determinar si hubo diferencias significativas en las variables de crecimiento entre aislados virales pertenecientes a diferentes subgrupos se realizó un análisis de varianza utilizando el programa EZAnalyze (versión 3.0) (Poynton, 2007) considerando una desviación estándar de 0,5 una potencia de 80% y un nivel de confianza de 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La medición de producción de virus extra celular de aislados de campo de VDVB, pareciera ser un buen sistema para identificar diferencias en virulencia; este concepto se apoya en la experiencia realizada por Mittelholzer *et al.*, (2000) que estudió el comportamiento *in vitro* de aislados de campo y cepas de VPPC de alta y baja virulencia, las cuales mostraron diferencias en la liberación de las partículas virales de la progenie desde la célula infectada, donde las cepas más virulentas, presentan una mayor razón entre viriones libres (extracelular) / viriones asociado a células (intracelular) a diferencia de la producción de RNA viral y la síntesis de proteínas virales que no manifestaron diferencias significativas entre virus de diferente virulencia.

Para conocer la cinética de crecimiento viral de aislados de VDVB, obtenidos de los CSA, de diferentes genotipos y subgrupos, previo a la inoculación de los virus en los cultivos celulares, se debió cuantificar la infecciosidad de cada uno, de modo de inocular una multiplicidad de infección 0,5 DICT₅₀ / célula en una población aproximada de 150.000 células. Los títulos fluctuaron entre 10^{4,5} a 10^{5,5} DICT₅₀/ 50µl, de manera que, los volúmenes de infección estuvieron entre 11,7 y 117,2 µl y se completaron con MEM. (Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2. Título de la infecciosidad de virus diarrea viral bovina obtenidos de alpacas (A) y llamas (LL) y volumen de los inóculos administrado a una población de 150.000 células.

Identificación del aislado	Título viral (DICT₅₀/50μl) *	Volumen del inóculo (μl) **	Genotipo y subgrupo
A 390	10 ⁵	37,5	1b
A 474	10 ⁵	37,5	1b
A 2	10 ⁵	37,5	1e
A 290	10 ^{4,5}	117,2	1e
A 502	10 ⁵	37,5	1e
LL 827	10 ^{5,5}	11,7	1e
LL 1087	10 ⁵	37,5	1e
LL 1723	10 ^{5,5}	11,7	1e
A 27	10 ⁵	37,5	2 ^a
LL 626	10 ⁵	37,5	2 ^a
LL 794	10 ⁵	37,5	2 ^a

*Valor recíproco de la dilución de virus que infecta el 50% de los cultivos celulares inoculados.

** Volumen que contiene 75.000 DICT₅₀

Para conocer la eficiencia de replicación de cada uno de los virus DVB aislados de CSA, se midió la cantidad de progenie viral (viriones) presente en el medio extracelular en los tiempos 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30 y 36 horas de incubación (gráficos 1,1; 1,2; 1,3). Del total de mediciones se obtuvieron los promedios de DICT₅₀/ml, resultantes de ocho repeticiones, que fluctuaron entre 10^{1,3} y 10^{6,9} DICT₅₀/ml (Cuadro N° 3).

Gráfico 1.1. Cinética de crecimiento de aislados del genotipo VDVB-1b

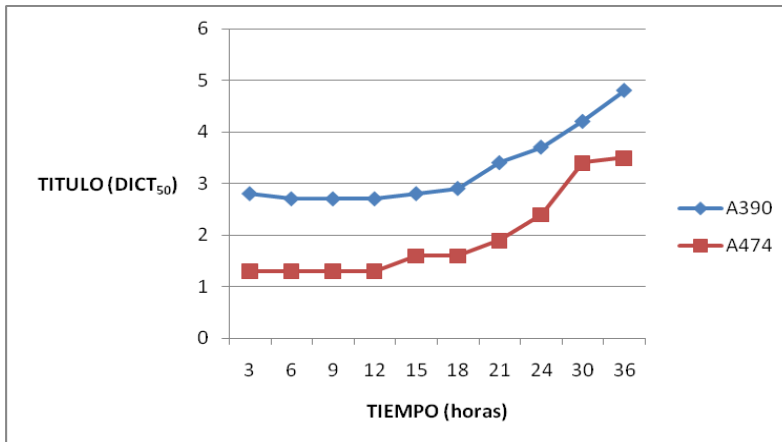


Gráfico 1.2. Cinética de crecimiento de aislados del genotipo VDVB-1e

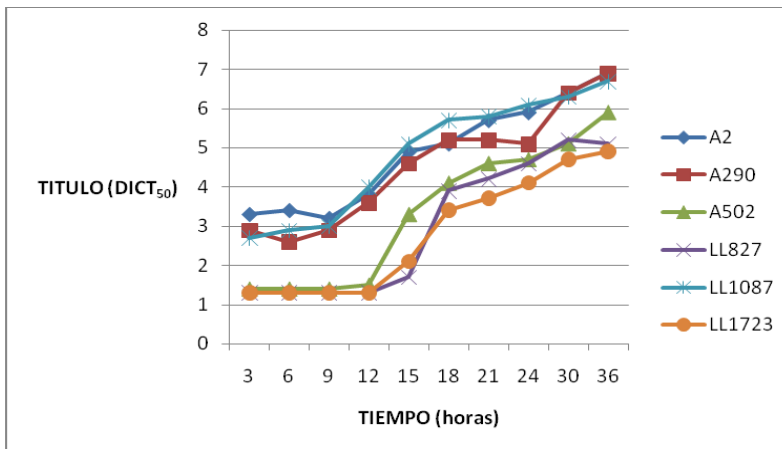
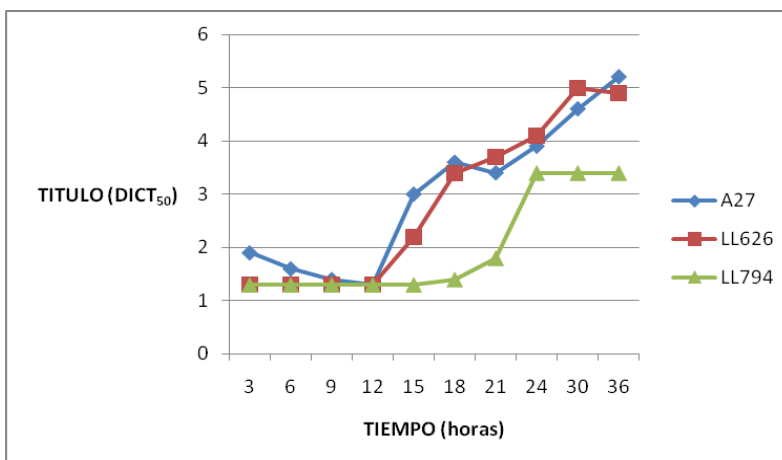


Gráfico 1.3. Cinética de crecimiento de aislados del genotipo VDVB-2a



Cuadro N° 3. Promedios de títulos del virus diarrea viral bovina (VDVB) aislados de alpacas (A) y llamas (LL) obtenidos en diferentes tiempos de incubación posteriores a la inoculación en cultivos celulares.

AISLADO (Genotipo y subgrupo)	TITULO VIRAL PROMEDIO (\log_{10})*/ml (HORAS POST INOCULACION)									
	(3)	(6)	(9)	(12)	(15)	(18)	(21)	(24)	(30)	(36)
A 390 (VDVB1b)	2,8	2,7	2,7	2,7	2,8	2,9	3,4	3,7	4,2	4,8
A 474 (VDVB1b)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,6	1,6	1,9	2,4	3,4	3,5
A 2 (VDVB1e)	3,3	3,4	3,2	3,8	4,9	5,1	5,7	5,9	6,4	6,9
A 290 (VDVB1e)	2,9	2,6	2,9	3,6	4,6	5,2	5,2	5,1	6,4	6,9
A 502 (VDVB1e)	1,4	1,4	1,4	1,5	3,3	4,1	4,6	4,7	5,1	5,9
LL 827 (VDVB1e)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,7	3,9	4,2	4,6	5,2	5,1
LL 1087 (VDVB1e)	2,7	2,9	3,0	4,0	5,1	5,7	5,8	6,1	6,3	6,7
LL 1723 (VDVB1e)	1,3	1,3	1,3	1,3	2,1	3,4	3,7	4,1	4,7	4,9
A 27 (VDVB2a)	1,9	1,6	1,4	1,3	3,0	3,6	3,4	3,9	4,6	5,2
LL 626 (VDVB2a)	1,3	1,3	1,3	1,3	2,2	3,4	3,7	4,1	5	4,9
LL 794 (VDVB2a)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4	1,8	3,4	3,4	3,4

* Promedio de ocho mediciones expresado como el valor recíproco de la dilución de virus que produce infección del 50% de los cultivos celulares inoculados.

El **periodo de eclipse** entregó promedios de 17,4 horas para el genotipo VDVB1b, 11,2 horas para el genotipo VDVB1e y 15 horas para el genotipo VDVB2a (Cuadro N° 4 y gráfico N° 2). Para esta variable, se estableció diferencias significativas entre los genotipos 1e y 1b, y entre los genotipos 1e y 2a, ($p < 0,05$), en cambio, los genotipos 1b y 2a, no presentaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$) (Cuadro N° 4). En el entendido de que el periodo de eclipse corresponde al tiempo que demora el virus, desde la entrada a la célula hasta la salida de nueva progenie viral, es posible considerar que los aislados del genotipo 1e serían potencialmente más virulentos que los aislados pertenecientes a los genotipos 1b y 2a, debido a que cuando se genera progenie viral en un menor tiempo, esto implicaría que el virus posea una ventaja frente a la velocidad que pudiera tener el hospedero para montar una respuesta inmune innata y más aun, adaptativa.

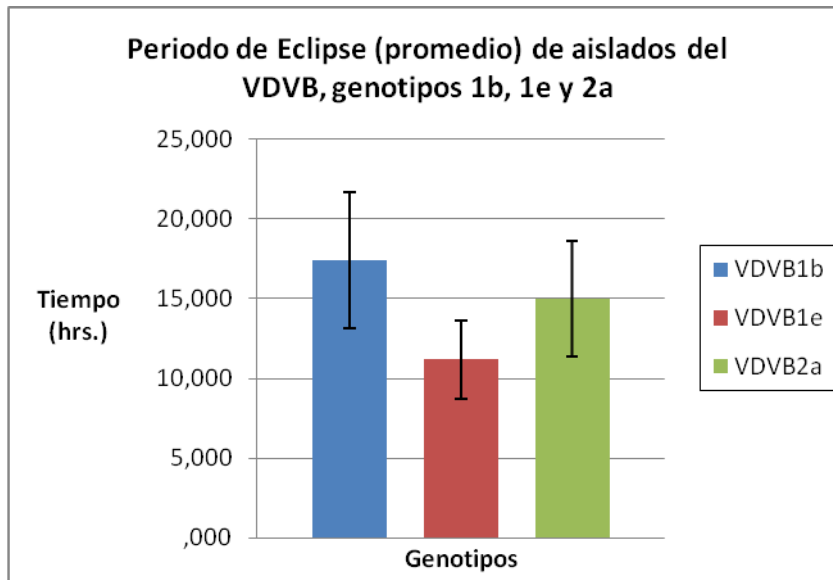
Cuadro N° 4. Periodo de eclipse promedio de aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.

GENOTIPO	AISLADO	PERIODO DE ECLIPSE* (hrs)	PROMEDIO
VDVB-1b	A390	15,7	17,4
	A474	19,1	
VDVB-1e	A2	10,1	11,2
	A290	9,7	
	A502	11,6	
	LL827	13,9	
	LL1087	8,2	
	LL1723	13,5	
VDVB-2a	A27	12	15
	LL626	13,5	
	LL794	19,5	

*. Corresponde al promedio de ocho mediciones

Estos valores, siguen la misma tendencia detectada por Montt, (2004) en un estudio de cinética de crecimiento viral en aislados de VDVB obtenidos de bovinos, ya que los periodos de eclipse fueron de tres, nueve y 15 horas para aislado de genotipo 1e, 2a y 1b, respectivamente (la identificación del subgrupo genómico de los aislados se realizó posteriormente). Cabe hacer notar que Gong *et al.*, (1996), para un aislado de VDVB (no especifica genotipo), tuvo un periodo de eclipse de 10 horas y Mittelholzer *et al.*, (2000) para seis aislados de VPPC tuvo periodos de eclipse que fluctuaron entre seis y 12 horas. Estos antecedentes demuestran que el tiempo que demoran los pestivirus en expresarse en el medio extracelular es variado, pudiendo ir desde 3 horas (Montt, 2004) hasta 19,13 horas como fue para el aislado A474 del genotipo 1b, pero en la mayoría de los casos el rango es entre nueve y 12 horas. El tiempo tomado por el virus para liberarse de la célula podría estar asociado a la virulencia, ya que cepas de VPPC de alta virulencia tuvieron periodos de eclipse de seis y nueve horas y en las cepas de mediana y baja virulencia los periodos de eclipse fueron de nueve y 12 horas (Mittelholzer *et al.*, 2000). Bajo este antecedente podría considerarse que los aislados de VDVB obtenidos de CSA del genotipo 1e serían más virulentos debido a que los promedios de tiempo fueron significativamente más bajos que los de genotipos 1b y 2a (Cuadro N° 11).

Gráfico N° 2. Periodo de eclipse promedio de aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.



El **virus residual** (que corresponde al virus no adsorbido ni eliminado con los lavados efectuados después del tiempo de una hora de adsorción) analizado, entregó los siguientes valores. Para los diferentes aislados virales estuvo entre $10^{1,3}$ a $10^{3,3}$ DICT₅₀ (Cuadro N° 5). La variación de hasta $10^{2,1}$ DICT₅₀ podría deberse a una diferente afinidad de los aislados por los receptores de la célula, ya que los procedimientos se realizaron en forma sincronizada, inoculando iguales cantidades de dosis de virus (75.000 DICT₅₀), sobre una similar cantidad de células (75.000) obtenidas de un mismo subcultivo celular. Además, en los procedimientos de siembra de los aislados y de lavado de las monocapas celulares inoculadas, se aplicó el mismo protocolo. Los virus fueron sometidos a iguales condiciones de temperatura y el título final considerado para cada aislado fue producto de un promedio de ocho repeticiones. Sin embargo, al considerar promedios de título viral para cada genotipo, las diferencias fueron menores con

valores de $DICT_{50}$ de 10^2 para el subgrupo 1b, $10^{2,1}$ para el subgrupo 1e y $10^{1,5}$ para el subgrupo 2a (Cuadro N° 5 y gráfico N° 3). Cabe destacar que, la variación de virus residual de cada aislado fue mínima, manteniéndose constante o con variación de 0,1 a 0,3 \log_{10} , con excepción del aislado A27 que presentó una variación de 0,6 \log_{10} . (anexo N° 1). Para esta variable, los subgrupos 1e y 1b presentaron diferencias significativas con el subgrupo 2a ($p < 0,05$), en cambio, los subgrupos 1b y 1e, no presentaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$) (Cuadro N° 11).

Cuadro N° 5. Virus residual promedio de aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.

GENOTIPO	AISLADO	TITULO VIRUS RESIDUAL *($DICT_{50}$)	PROMEDIO
VDVB-1b	A390	$10^{2,8}$	10^2
	A474	$10^{1,3}$	
VDVB-1e	A2	$10^{3,3}$	$10^{2,1}$
	A290	$10^{2,8}$	
	A502	$10^{1,4}$	
	LL827	$10^{1,3}$	
	LL1087	$10^{2,6}$	
	LL1723	$10^{1,3}$	
VDVB-2 ^a	A27	$10^{1,9}$	$10^{1,5}$
	LL626	$10^{1,3}$	
	LL794	$10^{1,3}$	

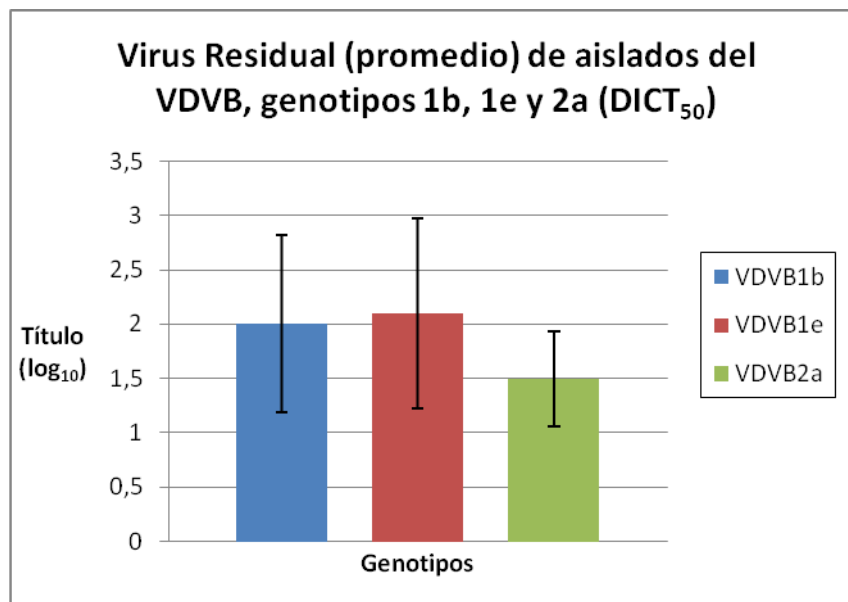
*. Corresponde al promedio de ocho mediciones

El indicador de virus residual es la cantidad de viriones que todavía no han entrado a la célula después de haber sido inoculado y por lo tanto son viriones que no pueden multiplicarse, haciendo que este virus sea menos hábil o potencialmente menos virulento. Aislados con una menor cantidad de virus

residual nos sugiere una mayor virulencia, ya que el virus tiene una mayor afinidad para entrar en la célula y comenzar a multiplicarse antes.

Al respecto, Mittelholzer *et al.*, (2000) señala que la infectividad de cepas de VPPC residuales no adsorbidos se mantuvieron completamente estables, en el medio de cultivo celular sobrenadante a 37° C por un periodo de al menos seis horas. Esta situación sería atribuible a la relativa mayor resistencia a la temperatura que presentan los pestivirus.

Gráfico N° 3. Virus residual promedio de aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.



El periodo de producción máxima de viriones fluctuó entre 26,2 a igual o más de 36 horas (Cuadro N° 6), con un promedio de 33,7 horas para el genotipo 1b; 34,1 horas para el genotipo 1e y de 30,5 horas para el genotipo 2a (Cuadro N°

6 y gráfico N° 4). El periodo de producción máxima es el tiempo comprendido desde el fin del periodo de adsorción hasta el tiempo en que se obtuvieron los mayores títulos de $DICT_{50}$, si bien este indicador mide la mayor cantidad de virus de cada aislado no describe la magnitud y en el caso de nuestro estudio tiene la limitante de que algunos aislados tienen promedios superiores a 36 horas, lo cual produce un sesgo en el caso de aquellos aislados que pudieran producir mayor cantidad fuera de ese tiempo establecido.

Cuadro N° 6. Periodo de producción máxima promedio de aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.

GENOTIPO	AISLADO	PERIODO DE PROD. MAXIMA *(hrs)	PROMEDIO
VDVB-1b	A390	36	33,7
	A474	31,5	
VDVB-1e	A2	36	34,1
	A290	35,2	
	A502	35,2	
	LL827	30	
	LL1087	34,5	
	LL1723	33,7	
VDVB-2 a	A27	35,2	30,5
	LL626	30	
	LL794	26,2	

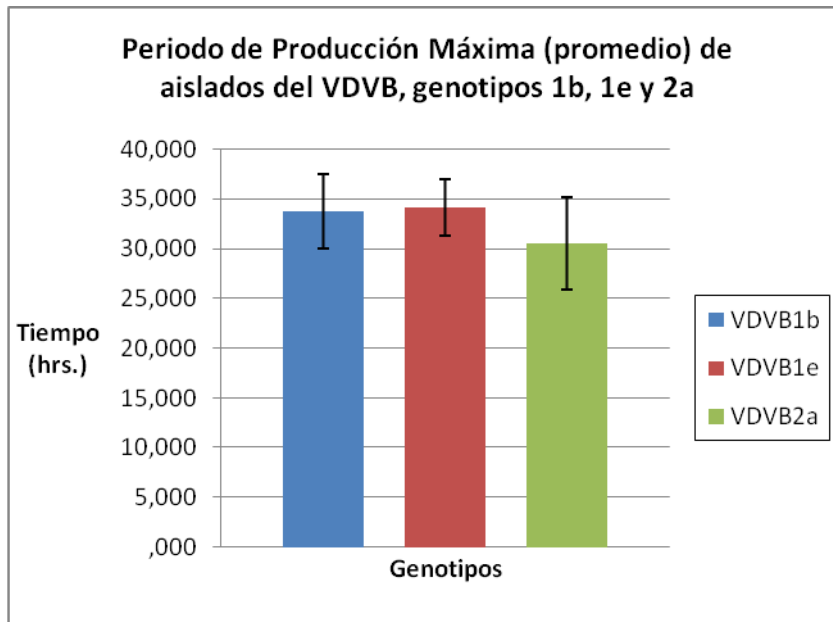
*corresponde al promedio de ocho mediciones.

El periodo correspondiente al subgrupo 2a fue significativamente diferente ($p < 0,05$) al del subgrupo 1e, y al del subgrupo 1b (cuadro N° 11).

El periodo entre los subgrupos 1b y 1e no tiene diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) (Cuadro N° 11), sin embargo, a pesar de presentarse estas diferencias, los tiempos registrados son mayores a las de otras curvas de

crecimiento de pestivirus: Montt, (2004), para aislados de VDVB de bovinos alcanzó la producción máxima de viriones a las nueve horas para el genotipo 1e, a las 12 horas para el genotipo 2a y a las 24 horas para el genotipo 1b, mientras que Gong *et al.*, (2006) para un aislado de VDVB el tiempo fue de 16 horas y Mittelholzer *et al.*, (2000) encontró que en cepas de VPPC, de diferente virulencia, el tiempo necesario para lograr la máxima producción de viriones fue de 30 horas en los de baja virulencia, a la vez que para una cepa de mediana y una de alta virulencia el tiempo necesario fue de 24 horas. La gran variabilidad de tiempos para alcanzar la máxima producción de viriones, en los diferentes estudios, podría atribuirse a propiedades intrínsecas de los diferentes virus o a diferentes condiciones experimentales como la dosis de virus administrada a los cultivos celulares, la susceptibilidad de las células para ser infectadas y la permisividad de ellas para multiplicar las partículas virales (Lindenbach *et al.*, 2007).

Gráfico N° 4. Periodo de producción máxima promedio de aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.



La producción máxima de viriones (mayor título logrado en el periodo de producción máxima) alcanzó valores que fluctuaron entre $10^{3,4}$ y $10^{6,9}$ de $DICT_{50}$, con valores promedios de $10^{4,2}$ para el genotipo 1b, $10^{6,1}$ para el genotipo 1e y $10^{4,6}$ para el genotipo 2a (Cuadro N° 7 y gráfico N° 5). El título de producción máxima es la cantidad de virus obtenida medida en $DICT_{50}$, este valor sirve para predecir la mayor virulencia de los aislados, pero no indica el tiempo necesario para conseguirlo. Un virus con un título de producción máxima mayor, será potencialmente más virulento que otro y en este caso, dado que las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$) entre los genotipos 1e en relación con 1b y con 2a, es posible asumir que el genotipo 1e sería el más virulento (Cuadro N° 11).

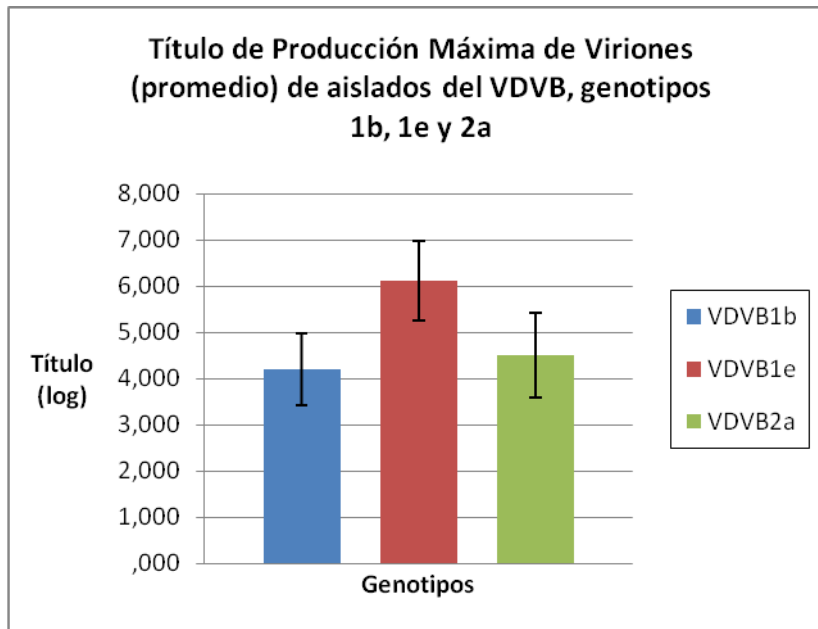
Cuadro Nº 7. Título de producción máxima de viriones promedio pertenecientes a aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.

GENOTIPO	AISLADO	TITULO PROD. MAXIMA ALCANZADO*(DICT ₅₀)	PROMEDIO
VDVB-1b	A390	10 ^{4,9}	10 ^{4,2}
	A474	10 ^{3,5}	
VDVB-1e	A2	10 ^{6,9}	10 ^{6,1}
	A290	10 ^{6,9}	
	A502	10 ^{5,9}	
	LL827	10 ^{5,2}	
	LL1087	10 ^{6,7}	
	LL1723	10 ^{4,9}	
VDVB-2a	A27	10 ^{5,2}	10 ^{4,6}
	LL626	10 ⁵	
	LL794	10 ^{3,4}	

*. Corresponde al promedio de ocho mediciones.

La variación en los niveles de producción máxima de los diferentes aislados fue más marcada que en los resultados obtenidos por Montt, (2004) en que los aislados de bovinos de genotipo 1e y 2a tuvieron 1log₁₀ menor de producción que un aislado de genotipo 1b, en cambio, Mittelholzer *et al.*, (2000), detectó que las diferencias en esta variable para el VPPC de mayor y menor virulencia fueron de algo más de 2 log₁₀.

Gráfico N°5. Título de producción máxima de viriones promedio pertenecientes a aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.



El **periodo de liberación de viriones** (tiempo en que se inicia la producción de viriones al tiempo del título máximo logrado) fluctuó entre 6,7 y 26,2 horas, con un promedio de 16,3 horas del genotipo 1b; 22,9 horas para el genotipo 1e y 15,5 horas para el genotipo 2a (Cuadro N° 8 y gráfico N° 6). El periodo de liberación de viriones corresponde al lapso de tiempo en el cual el virus se mantiene en multiplicación, hasta alcanzar el mayor título. Un virus con mayor periodo de producción de viriones es potencialmente más virulento.

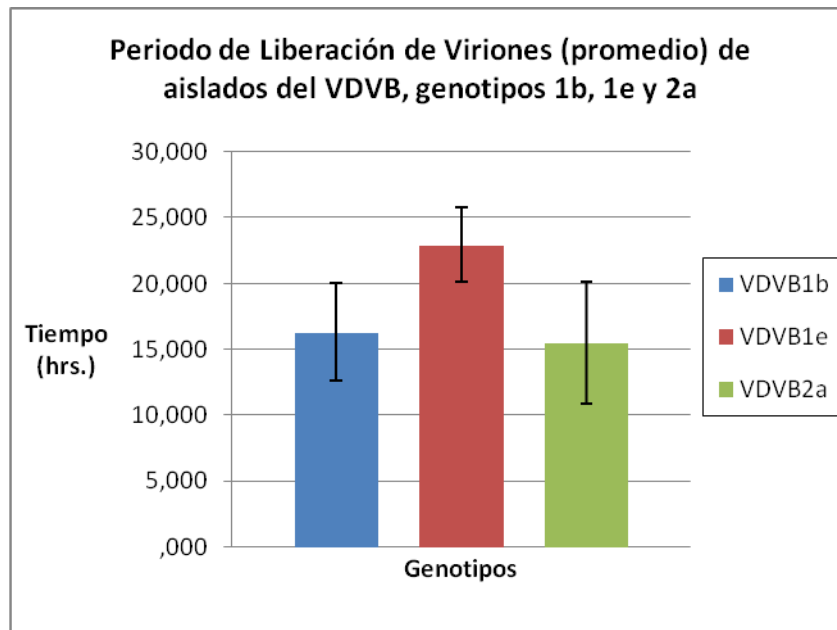
Cuadro N° 8. Periodo de liberación de viriones promedio de aislados del VDVB correspondientes a los subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.

GENOTIPO	AISLADO	PERIODO DE LIBERACION *(hrs)	PROMEDIO
VDVB-1b	A390	20,2	16,3
	A474	12,4	
VDVB-1e	A2	25,9	22,9
	A290	25,5	
	A502	23,6	
	LL827	16,1	
	LL1087	26,2	
	LL1723	20,2	
VDVB-2a	A27	23,2	15,5
	LL626	16,5	
	LL794	6,7	

*. Corresponde al promedio de ocho mediciones.

Para esta variable, se estableció diferencias significativas entre el subgrupo 1e con respecto a los subgrupos 1b y 2a, ($p < 0,05$), en cambio, los subgrupos 1b y 2a, no presentaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$) (Cuadro N° 11), resultados que son diferentes a los de Montt, (2004) que obtuvo periodos de liberación de VDVB, de 3 horas para el genotipo 2a y de 6 horas para el genotipo 1b y 1e, y a los de Gong *et al.*, (2006) que para el aislado viral bovino fue de 6 horas. Sin embargo, los resultados fueron más cercanos a los obtenidos por Mittelholzer *et al.*, (2000) con las cepas de VPPC en que los tiempos de liberación máxima de viriones fueron de 15 a 21 horas, siendo más prolongados en las cepas de alta virulencia (21 horas). De todas formas, el periodo de liberación de viriones del genotipo 1e significativamente mayor a los genotipos 1b y 2a, hace suponer que el genotipo 1e sería más virulento que los otros dos.

Gráfico N° 6. Periodo de liberación de viriones promedio de aislados del VDVB correspondientes a los subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.



La **liberación máxima de viriones** (mayor título logrado en el periodo de liberación de viriones) alcanzó títulos que fluctuaron entre 10^2 y $10^{4,4}$ DICT₅₀, con un promedio de $10^{2,1}$ para el genotipo 1b, $10^{3,9}$ para el genotipo 1e y 10^3 para el genotipo 2a (Cuadro N° 9 y gráfico N° 7). Debido a que este indicador corresponde a la mayor cantidad de virus total alcanzado en todo el periodo, un aislado viral con un título de liberación mayor, indicaría una virulencia potencialmente mayor que la de un aislado con un menor título.

Para este indicador fue posible encontrar diferencias significativas entre los tres genotipos ($p < 0,05$) (Cuadro N° 11).

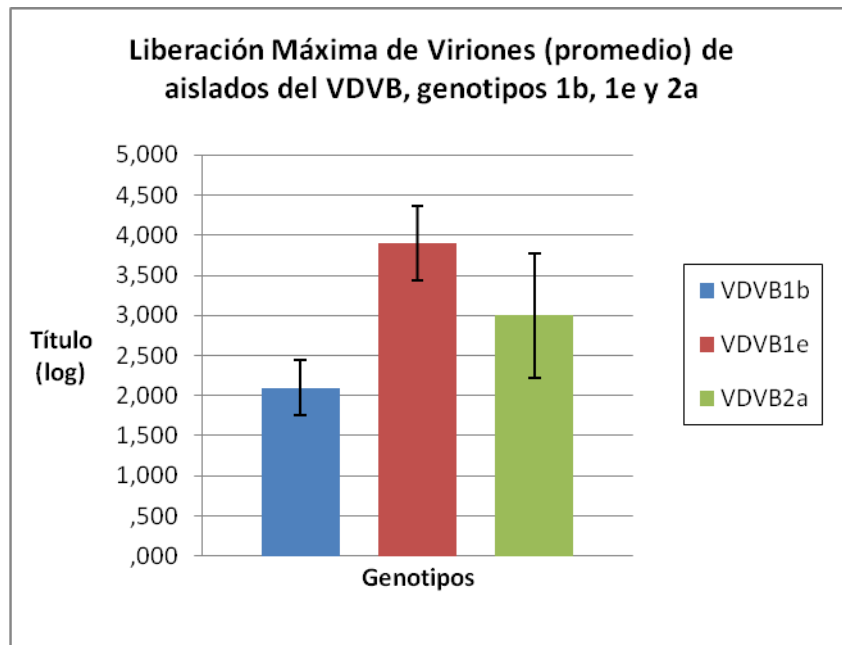
Cuadro Nº 9. Título de liberación máxima de viriones promedio correspondientes a aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.

GENOTIPO	AISLADO	TITULO DE LIBERACION MAXIMA* (DICT ₅₀)	PROMEDIO
VDVB-1b	A390	10 ²	10 ^{2,1}
	A474	10 ^{2,2}	
VDVB-1e	A2	10 ^{3,6}	10 ^{3,9}
	A290	10 ⁴	
	A502	10 ^{4,4}	
	LL827	10 ^{3,9}	
	LL1087	10 ⁴	
	LL1723	10 ^{3,6}	
VDVB-2a	A27	10 ^{3,3}	10 ³
	LL626	10 ^{3,7}	
	LL794	10 ^{2,1}	

*. Corresponde al promedio de ocho mediciones.

Contrariamente a estos resultados Montt, (2004), obtuvo una mayor liberación de viriones (1 log₁₀) con el subgrupo 1b en relación a los subgrupos 1e y 2a, pero, Mittelholzer *et al.*, (2000) demostró que las cepas de VPPC más virulentas para los cerdos excretan una mayor cantidad de virus al extracelular que las cepas menos virulentas.

Gráfico N° 7. Título de liberación máxima de viriones promedio correspondientes a aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.



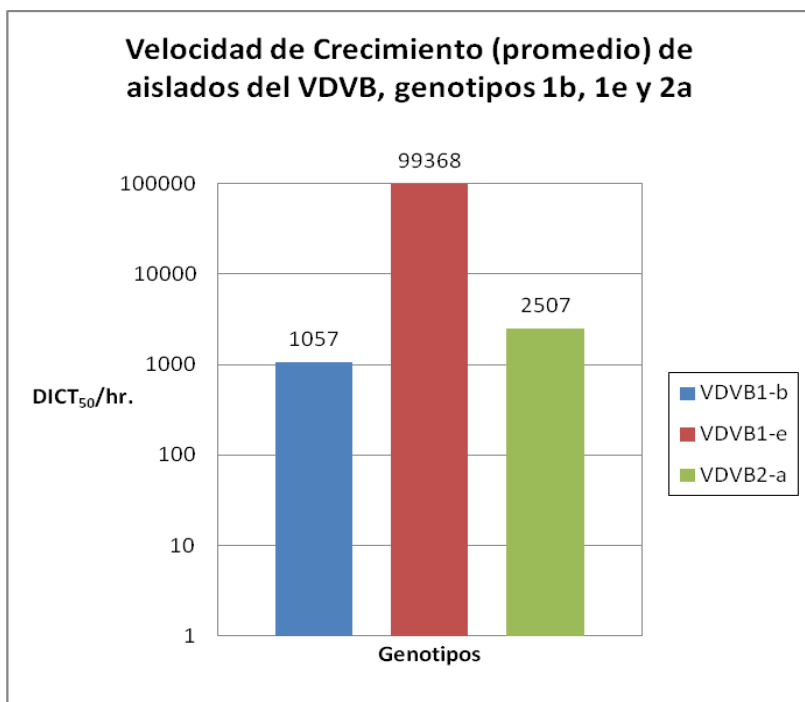
La **velocidad de crecimiento** (que corresponde al cociente entre la producción máxima de viriones y el periodo de producción máxima de viriones), fluctuó entre 85,5 y 234275,8 $DICT_{50}$ / hora (Cuadro N° 10), con un promedio de 1057,1 $DICT_{50}$ / hora para el genotipo 1b; 99368,1 $DICT_{50}$ / hora para el genotipo 1e y 2558 $DICT_{50}$ / hora para el genotipo 2a y (Cuadro N° 10 y gráfico N° 8), valores con diferencias estadísticas significativas entre los tres genotipos ($p < 0,05$) (Cuadro N° 11). La velocidad de multiplicación es un indicador más confiable ya que relaciona cantidad de viriones producidos en una unidad de tiempo establecida. Esto permite establecer que un virus con mayor velocidad de crecimiento será potencialmente más virulento.

Cuadro Nº 10. Velocidad de crecimiento promedio correspondiente a aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.

GENOTIPO	AISLADO	VELOCIDAD* (DICT ₅₀ /hr.)	PROMEDIO
VDVB-1b	A390	2028,7	1057,1
	A474	85,5	
VDVB-1e	A2	234275,8	99368,1
	A290	202874,5	
	A502	20287,4	
	LL827	4999,3	
	LL1087	131743	
	LL1723	2028,7	
VDVB-2 a	A27	4166,1	2558
	LL626	3246,4	
	LL794	111,1	

*. Corresponde al promedio de ocho mediciones.

Gráfico Nº 8. Velocidad de crecimiento promedio, correspondientes a aislados del VDVB, subgrupos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos.



Cuadro Nº 11. Medidas estadísticas para las distintas variables de crecimiento de aislados de VDVB obtenidos de alpacas y llamas según genotipo.

	GENOTIPO 1b		GENOTIPO 1e		GENOTIPO 2a	
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar
Período Eclipse (hrs) A	17,4 (b)*	4,27	11,2 (a)	2,45	15 (b)	3,64
Título virus Residual (DICT₅₀) B	2 (a)	0,82	2,1 (a)	0,87	1,5 (b)	0,44
Período de Producción Máxima (hrs) C	33,7 (a)	3,71	34,1 (a)	2,81	30,5 (b)	4,65
Título producción Máxima Alcanzado D	4,2 (b)	0,78	6,1 (a)	0,86	4,6 (b)	0,92
Período de Liberación (hrs) (C-A)	16,3 (b)	3,71	22,9 (a)	2,81	15,5 (b)	4,65
Título de Liberación Máxima (D-B)	2,1 (c)	0,35	3,9 (a)	0,46	3 (b)	0,78
Velocidad (hrs) D/C	470 (c)		36918 (a)		1305 (b)	

*. (a), (b), (c): indican similitud o diferencias estadísticas significativas de las diferentes variables de crecimiento, entre los genotipos evaluados.

A pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas en las variables título de virus residual y periodo de producción máxima de virus infecciosos, los aislados del VDVB subtipo 1e serían potencialmente más virulentos que los VDVB del subtipo 1b y 2a por presentar una mayor eficiencia replicativa en los siguientes indicadores: periodo eclipse, título producción máxima, periodo de liberación, título de liberación máxima y velocidad de crecimiento los que mostraron diferencias estadísticamente significativas.

De todos estos indicadores, el periodo de eclipse, título de producción máxima, periodo de liberación fue donde se encontraron los mayores cambios entre el subtipo VDVB-1e con los otros subtipos VDVB-1b y VDVB-2a.

Entre los aislados del subtipo VDVB-1b y VDVB- 2a no existen diferencias estadísticamente significativas entre los indicadores de periodo de eclipse, título de producción máxima y periodo de liberación de virus infecciosos aun así podemos considerar que estos poseen diferente virulencia potencial ya que poseen diferencias entre los siguientes indicadores: título de virus residual, periodo de producción máxima, título de liberación máxima.

A pesar de que previamente se tipificaron los aislados utilizados en este estudio comprobando su origen desde bovinos, esta memoria confirma la capacidad del virus obtenido de camélidos, de multiplicarse en células de riñón bovino.

En consideración de que los cuadros más severos están asociados con inmunodepresión, como también con cuadros de trombocitopenia asociados a hemorragias, es recomendable complementar estos resultados con estudios

similares realizados en células de alpaca y llamas, especialmente de tejido linfóide o con megacariocitos precursores de las plaquetas.

Los resultados obtenidos en esta memoria si bien dan cuenta potencialmente de diferentes grados de virulencia de los aislados de VDVB, para establecer la patogenicidad del virus, es necesario realizarlo *in vivo* a través de la inoculación experimental de estos virus en alpacas y/o llamas susceptibles a la infección viral.

CONCLUSIONES

En conclusión, el análisis de la multiplicación viral en células MDBK, en un periodo de 36 horas de diferentes aislados del Virus Diarrea Viral Bovina obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos ubicados en la Región Metropolitana, muestra que, basado en distintos indicadores del ciclo infectivo viral, los aislados virales correspondientes al subtipo VDVB-1e serían potencialmente más virulentos que los correspondientes a los subtipos VDVB-1b y VDVB-2a.

De los parámetros del ciclo infectivo viral analizados, el periodo de eclipse, el título de producción máxima, el periodo de liberación y velocidad, fueron los que estadísticamente mostraron las mayores diferencias entre subtipo VDVB-1e con respecto a los otros dos subtipos analizados, lo que demostraría una mayor eficiencia replicativa del subtipo VDVB-1e con respecto a los subtipos VDVB-1b y VDVB-2a.

Con respecto a los parámetros del ciclo infectivo viral de los subtipos VDVB-1b y VDVB-2a, se encontró diferencias estadísticamente significativas en el título de virus residual, periodo de producción máxima, título de liberación máxima y velocidad, lo que potencialmente indicaría una diferencia en la virulencia entre ambos subtipos.

BIBLIOGRAFIA

AMES, T.R. 1986. The causative agent of BVD: Its epidemiology and pathogenesis. *Vet. Med* 81: 848-869.

AMSTEL, S.; KENNEDY, M. 2010. Bovine viral diarrhea infections in new world camelids – A review. *Small Rumin. Res.* 91: 121-126.

ARCE, C.A. 2001. Infección por pestivirus en un rebaño de alpacas de la zona central de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 42p.

ARNAL, M.C.; FERNANDEZ-DE-LUCO, D.; RIBA, L.; MALEY, M.; GIRLAY, J.; WILLOUGHBY, K.; VILČEK, Š.; NETTLETON, P. 2004. A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *J. Gen. Virol* 85: 3653-3657.

AVALOS-RAMIREZ, R.; ORLICH, M.; THIEL, H.; BECHER, P. 2001. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286: 456-465.

BACHOFEN, C.; STALDER, H.; BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; PETERHANS, E. 2008. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Vet. Microbiol.* 131: 93-102.

BAKER, J. 1990. Clinical aspects of bovine diarrhoea virus infection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz* 9: 25-41.

BEAMIN, J. 2009. Parentesco genómico de aislados de pestivirus obtenidos de ovejas, cabras, alpacas y llamas naturalmente infectadas mediante el análisis de

una fracción del gen de la proteína E2. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 78 p.

BECHER, P.; ORLICH, M.; SHANNON, A. D.; HORNER, G.; KÖNIG, M.; THIEL, H. J. 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* 78: 1357-1366.

BECHER, P.; ORLICH, M.; KÖNIG, M.; THIEL, H.J. 1999a. Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J. Virol.* 73:5646-53.

BECHER, P.; ORLICH, M.; KOSMIDOU, A.; KÖNIG, M.; BAROTH, M.; THIEL, H. J. 1999b. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262: 64-71.

BECHER, P.; ORLICH, M.; THIEL, H.J. 2000. Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus result in altered growth characteristics. *J. Virol* 74:7884–7894.

BECKER, Y. 2000. Evolution of viruses by acquisition of cellular RNA or DNA nucleotide sequences and genes: An introduction. *Virus Genes* 21: 7–12.

BELKNAP, E.; COLLINS, J.; LARSEN, R.; CONRAD, K. 2000. Bovine viral diarrhea virus in New World camelids. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 568–570.

BIELEFELDT-OHMANN, H.; BLOCH, B. 1982. Electron microscopic studies of bovine viral diarrhea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. *Arch. Viro.* 71(1): 57–74.

BOLIN, S.; LITTLEDIKE, E.; RIDPATH, J. 1991. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea viruses in a vaccinated herd. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1033-1037.

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; BLACK, J.; MACY, M.; ROBLIN, R. 1994. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods.* 48(2-3):211-21.

BOLIN, S. R.; GROOMS, D. L. 2004. Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20: 51-68.

BOLIN, S.; RIDPATH, J. 1992. Difference in virulence between two noncytopathic bovine diarrhoea virus in calves. *J. Am. Vet. Med. Res.* 53: 2157-2163.

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. 1998. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 135-9.

BOULANGER, D.; MIGNON, B.; WAXWEILER, S.; PASTORET, P. 1992. Données récentes sur la biologie moléculaire du pestivirus responsable de la maladie des muqueuses (BVD/MD). *Ann. Méd. Vét.* 136: 33-38.

BRANZA-NICHITA, N.; DURANTEL, D.; CARROUEE-DURANTEL, S.; DWEK, R.A.; ZITZMANN, N. 2001. Antiviral effect of N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhoea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers. *J. Virol.* 75: 3527-3536.

BROCK, K. 2004. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. Food Anim.* 20: 1-3.

BROCK, K.; GROOMS, D.; GIVENS, D. 2005. Reproductive Disease and Persistent Infections. In: Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control. Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 145–156.

BROWNLIE, J. 1990. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. Rev. Sci. Technical 9: 43-59.

BYERS, S.; EVERMANN, J.; BRADWAY, D.; PARISH, S.; BARRINGTON, G. 2010. Evaluation of a commercial bovine viral diarrhoea virus vaccine in nonpregnant female alpacas (*Vicugna pacos*). Vaccine 28: 591-593.

CARMAN, S. 1995. Typing of Ontario BVD virus isolates from 1981 to 1994. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Guelph.

CARMAN S, VAN DREUMEL T, RIDPATH J, HAZLETT, M.; ALVES, D.; DUBOVI, E.; TREMBLAY, R.; BOLIN,S.; GODKIN, A.; ANDERSON, N. 1998. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. J. Vet. Diagn. Invest. 10: 27–35.

CARMAN, S.; CARR, N.; DELAY, J.; BAXI, M.; DEREGT, M.; HAZLETT. 2005. Bovine viral diarrhoea virus in alpaca: abortion and persistent infection. J. Vet. Diagn. Invest. 17: 589–593.

CASARO, A.; KENDRICK, J.; KENNEDY, P. 1971. Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. Am. J. Vet. Res. 32: 1543–1562.

CELEDÓN, M.; VARGAS, C.; SALINAS, A.; CASANOVA, A.; IBARRA, L.; BERRIOS, P. 1996. Prevalencias serológicas para el virus de la diarrea viral bovina y de la rinotraqueítis infecciosa bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. Av. Cs. Vet. 11: 75-80.

CELEDÓN, M.; ROCO, L.; QUINTEROS, G.; SANTIBÁÑEZ, M.; BERRIOS, P.

1997a. Puesta en evidencia del virus de la diarrea viral bovina en bovinos clínicamente afectados. Arch. Med. Vet. 29: 189-195.

CELEDÓN, M.; PALACIOS, L.; PIZARRO, J.; IBARRA, L. 1997b. Prevalencia de anticuerpos seroneutralizantes para el virus de la diarrea viral bovina en ganado de carne de la Región Metropolitana de Chile. Av. Cs. Vet..12: 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: 125-132.

CELEDÓN, M.; SANDOVAL, A.; DROGUETT, J.; CALFIO, R.; ASCENCIO, L.; PIZARRO, J.; NAVARRO, C. 2001. Survey for antibodies to pestivirus and herpesvirus in sheep, goats, alpacas (*Lama pacos*) guanacos (*Lama guanicoe*) and vicuña (*Vicugna vicugna*) from Chile. Arch. Med. Vet. 33: 162–175.

CELEDÓN, M.; OSORIO, J.; PIZARRO, J. 2006. Aislamiento e identificación de pestivirus obtenidos de alpacas (*Lama pacos*) y llamas (*Lama glama*) de la Región Metropolitana, Chile. Arch. Med. Vet. 38: 247-252.

CHILDS, T. 1946. X disease of cattle—Saskatchewan. Can. J. Comp. Med. 10: 316–319.

CHON, S.K.; PEREZ, D.R.; DONIS, R.O. 1998. Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhea virus. Virology 25: 370-382.

COLLETT, M.; LARSON, R.; BELZER, S.; RETZEL, E. 1988. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genome organization of a pestivirus. Virology 165: 200-208.

CORAPI, W.; ELLIOTT, R.; FRENCH, T.; ARTHUR, D.; BEZEK, D.; DUBOVI, E 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196: 590-596.

CORTESE, V.S.; WEST, K.H.; HASSARD, L.E. 1998. Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213: 1312–1319.

DENG, R.; BROCK, K.V. 1993. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: Primary and secondary structure analyses. *Nucl. Acids Res.* 2: 1949-1957.

DEREGT, D. 2005. Introduction and history. In: Goyal SM, Ridpath JF, (Eds). *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control.* Ames (IA): Blackwell Publishing. pp 3–34.

DONE, J.; TERLECKI, S.; RICHARDSON, C.; HARKNESS, J.; SANDS, J.; PATTERSON, D.; SWEASEY, D.; SHAW, I.; WINKLER, C.; DUFFELL, S. 1980. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet. Rec.* 106: 473–479.

DUFFEL, S.J.; HARKNESS J.W. 1985. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.* 117: 240-245.

EDWARDS, S. 1990. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9: 115-130.

EDWARDS, S.; WOOD, L.; BROCKMAN, S.; IBATA, G. 1991. Clinical and virological observations of a mucosal disease outbreak with persistently infected seropositive survivors. *Arch. Virol. Suppl.* 3: 125–132.

EDWARDS, S.; PATTON, D. 1995. Antigenic differences among pestiviruses. *Vet. Clinics North Am. Food Anim. Pract.* 1: 563–577.

ELLIS, J.; DAVIS, W.; BELDEN, E.; PRATT, D. 1988. Flow cytofluorimetric analysis of lymphocyte subset alteration in cattle infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Pathol.* 25: 231–236.

EVERMANN, J.; BARRINGTON, G. 2005. Clinical Features. **In:** Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). *Bovine viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control.* Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 105-120.

FAIRBANKS, K.; SCHNACKEL, J.; CHASE, C.C. 2003. Evaluation of a modified live virus type-1a bovine viral diarrhoea virus vaccine (Singer strain) against a type-2 (strain 890) challenge. *Vet. Ther.* 4: 24–34.

FIEDLER, H.; CUBILLOS, V.; PAREDES, E.; REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S.; NIEDDA, M.; AGUILAR, M. 1986. Enfermedad mucosa/diarrea viral bovina. Hallazgos anatomopatológicos de los primeros casos en Chile. *Arch. Med. Vet.* 18: 151-155.

FLORES, E.; RIDPATH, J.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.; GIL, L. 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.* 87: 51-60.

FOSTER, A.P.; HOULIHAN, M.G.; HOLMES J.P.; WATT, E.J.; HIGGINS, R.J.; ERRINGTON, J.; IBATA, G.; WAKELEY, P.R. 2007. Bovine viral diarrhoea virus infection of alpacas (*Vicugna pacos*) in the UK. *Vet. Rec.* 161: 94–99.

FREDRIKSEN, B.; PRESS, C.; LOKEN, T; ODEGAARD, S. 1999. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 64: 109–122.

FUENTES, R.A. 2007. Pesquisa de anticuerpos neutralizantes del virus de la diarrea viral bovina en alpacas y llamas del altiplano de la Región de Tarapacá. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 39p.

FULTON, R.; STEP, D.; RIDPATH, J.; SALIKI, J.; CONFER, A.; JOHNSON, B.; BRIGGS, R.; HAWLEY, R.; BURGE, L.; PAYTON, M. 2003. Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and Mannheimia haemolytica bacterin-toxoid. *Vaccine* 21: 2980–2985.

GILLESPIE, J.; BAKER, J.; McENTEE, K. 1960. A cytopathogenic strains of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet.* 50:73–9.

GILLESPIE, J.H.; COGGINS, L.; THOMPSON, J.; BAKER, J.A. 1961. Comparison by neutralization test of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease. *Cornell Vet.* 51:155-159.

GOENS, D. 2002. The evolution of bovine viral diarrhoea: A review. *Can. Vet. J.* 43: 946-954.

GONG, Y.; TROWBRIDGE, R.; MACNAUGHTON, T.B.; WESTAWAY, E.G.; SHANNON, A.D.; GOWANS, E.J. 1996. Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol.* 77:2729–2736.

GOYAL, S.; BOULJIHAD, M.; HAUGERUD, S.; RIDPATH, J. 2002. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from an alpaca. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 523-525.

GOYAL, S. 2005. Diagnosis. In: Goyal, M.; Ridpath, J. Bovine Viral Diarrhea Virus Diagnosis, Management and Control. 1 ed. Estados Unidos, Blackwell Publishing. pp. 197-208.

GRASSMANN, C.; ISKEN, O.; BEHRENS, S. 1999. Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhoea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *Vet. Microbiol.* 73: 9196-9205.

GRAY, E.W.; NETTLETON, P.F. 1987. The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *J. Gen. Virol.* 68:2339–2346.

GROOMS, D. 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20: 5-19.

GRUMMER, B.; BEER, M.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; GREISER-WILKE, I. 2001. Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* 82: 2597–605.

HAMERS, C.; DEHAN, P.; COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; KERKHOF, P.; PASTORET, P.P. 2001. Diversity among bovine pestiviruses. *Vet. J.* 161(2):112–122.

HAMERS, C.; LECOMTE, C.; KULCSAR, G.; LAMBOT, M.; PASTORET, P.P. 1998. Persistently infected cattle stabilise bovine viral diarrhoea virus leading to herd specific strains. *Vet. Microbiol.* 6: 177–182.

HARASAWA, R.; GIANGASPERO, M.; IBATA, G.; PATON, D. J. 2000. Giraffe strain of pestivirus: its taxonomic status based on the 5'-untranslated region. *Microbiol. Immunol.* 44: 915-921.

HIETALA, S. K.; CROSSLEY, B. M. 2005. Virus replication. In: Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 81-89.

HORZINECK, M.C. 1990. Bovine virus diarrhoea: an introduction. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 9: 13-23.

JONES, L.R.; ZANDOMENI, R.; WEBER, E.L. 2002. Quasispecies in the 5' untranslated genomic region of bovine viral diarrhoea virus from a single individual. J. Gen. Virol. 83: 2161-2168.

KABONGO, N.; BAULE, C.; VAN VUUREN, M. 2003. Molecular analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from South Africa. Onderstepoort. J. Vet. Res. 70: 273-279.

KELLING, C.L.; STEFFEN, D.J.; TOPLIFF, C.L.; ESKRIDGE, K.M.; DONIS, R.O.; HIGUCHI, D.S. 2002. Comparative virulence of isolates of bovine viral diarrhoea virus type II in experimentally inoculated six- to nine-month-old calves. Am. J. Vet. Res. 63:1379-1384.

KIRKLAND, P.D.; FROST, M.J.; FINLAISON, D.S.; KING, K.R.; RIDPATH, J.F.; GU, X. 2007. Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. Virus Res. 129: 26–34.

KNIAZEFF, A.J.; HUCK, R.A.; JARRETT, W.F.H. 1961. Antigenic relationship of some bovine viral diarrhoea-mucosal disease viruses from the United States, Great Britain, and West Germany. Vet. Rec. 73: 768-769.

LEE, K.M.; GILLESPIE, J.H. 1957. Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. Am. J. Vet. Res. 18: 952–953.

LI, Y.; Mc NALLY, J. 2001. Characterization of RNA synthesis and translation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Virus Genes* 23: 149–155.

LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.E.; NEILL, J.D. 2002. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral diarrhoea virus type 2 in calves. *Am. J. Vet. Res.* 63: 1575–1584.

LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.E.; NEILL, J.D. 2003. Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2. *Biologicals* 3: 119–122.

LIEBLER-TENORIO, E. 2005. Pathogenesis. **In:** Goyal, M.; Ridpath, J. *Bovine Viral Diarrhoea Virus Diagnosis, Management and Control*. 1 ed. United States, Blackwell Publishing, 2005. pp. 121-144.

LINDENBACH, B.; THIEL, H.; RICE, C. 2007. Flaviviridae: The Virus and their Replication. **In:** Knipe, D.; Howley, P. *Fields Virology*. 5th Edition. Philadelphia, USA. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins (Ed). pp 1101-1152.

LIU, L.; XIA, H.; WAHLBERG, N.; BELÁK, S.; BAULE, C. 2009. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology* 385: 351-357.

MATTSON, D.; BAKER, R.; CATANIA, J.; IMBUR, S.; WELLEJUS, K.; BELL, R. 2006. Persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in an alpaca. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228: 1762–1765.

MÉNDEZ, E.; RUGGLI, N.; COLLET, M.; RICE, C. 1998. Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 72: 4737-4745.

MEYERS, G.; TAUTZ, N.; STARK R.; BROWNLIE, J.; DUBOVI, E.J.; COLLET, M.S.; THIEL, H.J. 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 191: 368–386.

MEYERS, G.; THIEL, H. 1996. Molecular characterization of pestivirus. *Adv Virus Res* 47: 53-118.

MIRANDA, M.P. 2000. Determinación ultrasonográfica de los periodos de pérdidas embrio-fetales durante la gestación en alpacas (*Lama pacos*). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 66p.

MITTELHOLZER, C.; MOSER, C.; TRATSCHIN, J-D; HOFFMANN, M. 2000. Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains. *Vet. Microbiol.* 74: 293-308.

MONTT, J.M. 2004. Caracterización biológica de aislados nacionales del virus diarrea viral bovina perteneciente a los genotipos I y II. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 65 páginas.

MOYA, A.; ELENA, S.F.; BRACHO, A.; MIRALLES, R.; BARRIO, E. 2000. The evolution of RNA viruses: A population genetics view. *Proc. Natn. Acad. Sci.* 97: 6967-6973.

MÜLLER, C. 2003. Aislamiento e identificación de pestivirus y herpesvirus obtenidos de ovinos y caprinos de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias 77p.

MURPHY, F.; GIBBS, E.; HORZINEK, M.; STUDDERT, M. 1999. *Veterinary Virology*. 3rd ed. New York, USA. Academic Press. 629 p.

MURPHY, F.; FAUQUET, C.; BISHOP, D.; GHABRIAL, S.; JARVIS, A.; MARTELLI, G.; MAYO, M.; SUMMERS, M. (Eds.). 1995. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol. Suppl. 10: 415-427.

NETTLETON, P. F. 1990. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. Rev. Sci. Tech. 9(1): 131-150.

NUTTALL, P.A. 1980. Growth characteristics of two strains of bovine viral diarrhoea virus. Arch. Virol. 66: 365–369.

OLAFSON, P.; MCCALLUM, A.; FOX, F. 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. Cornell Vet. 36: 205–213.

PATON, D. J.; CARLSSON, U.; LOWINGS, J. P.; SANDS, J. J.; VILCEK, Š.; ALENIUS, S. 1995. Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. Vet. Microbiol. 43: 283-294.

PAVLOVIC, D.; NEVILLE, D.C.; ARGAUD, O.; BLUMBERG, B.; DWEK, R. A.; FISCHER, W.B.; ZITZMANN, N. 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. Proc Natl Acad Sci U S A. 100: 6104–6108.

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

PIZARRO-LUCERO, J.; CELEDON, M.; AGUILERA, M.; DE CALISTO, A. 2006. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. Vet. Microbiol. 115: 208-217.

POYNTON, T. 2007. EzAnalyze: Data Tools for Educators. [en línea] <<http://www.ezanalyze.com/>> [consulta: 22-07-2011].

PUCK, T.; CIENVRA, S.; ROBINSON, A. 1961. Genetics of somatic mammalian cells. *J. Exp. Med.* 33: 339-349.

PURCHIO, A.F.; LARSON, R.; COLLETT, M.S. 1983. Characterization of virus-specific RNA synthesized in bovine cells infected with bovine viral diarrhea virus. *J Virol* 48:320-324.

QUADROS, V.; MAYER, S.; VOGEL, F.; WEIBLEN, R.; BRUM, M.; ARENHART, S.; FLORES, E. 2006. A search for RNA insertions and NS3 gene duplication in the genome of cytopathic isolates of bovine viral diarrhea virus. *Braz.J Med. Biol. Res.* 39: 935–944.

RADOSTITS, O.; LITTLEJOHNS, I. 1988. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus. *Can. Vet. J.* 29: 513-528.

RAMSEY, F.; CHIVERS, W. 1953. Mucosal disease of cattle. *North Am. Vet.* 34: 629–633.

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

REINHARDT, G.; RIEDEMANN, T.M.; FIEDLER, H.; NIEDDA, M.; AGUILAR, M.; CUBILLOS, B.; PAREDES, E. 1986. Diarrea viral bovina/enfermedad mucosa. Primer aislamiento del agente causal en Chile. *Arch. Med. Vet.* 18: 157-161.

REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S.; ERNEST, S.; AGUILAR, M.; ENRIQUEZ, M. 1990. Seroprevalence of bovine viral diarrhea/mucosal disease in Southern Chile. *Prev. Vet. Med.* 10: 73-78.

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

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. 1995. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* 212: 39–46.

RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D.; FREY, M.; LANDGRAF, J.G. 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet. Microbiol.* 77:145–155.

RIDPATH, J.F. 2003. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals* 20: 127-131.

RIDPATH, J. 2005. Classification and molecular biology. **In:** Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control*. Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 65-80.

RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D.; VILCEK, Š. 2006. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet. Microbiol.* 114:196–204.

RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D.; PETERHANS, E. 2007. Impact of variation in acute virulence of BVDV1 strains on design of better vaccine efficacy challenge models. *Vaccine* 25: 8058–8066.

RIDPATH, J. F. 2010. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26: 105-121.

RIDPATH, J.F.; FULTON, R.W.; KIRKLAND, P.D.; NEILL, J.D. 2010. Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22: 184-191.

RIEDEMANN, S.; TADICH, N.; REINHARDT, G.; MONTECINOS, M.; AGUILAR, M. 1991. Pesquisa serológica de PI-3, BHV-1 y BVDV en ovinos de 11 predios de la X Región, Chile. *Arch. Med. Vet.* 2: 185-187.

ROEDER, P.; JEFFREY, M.; CRANWELL, M. 1986. Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequelae with fetal maturation. *Vet. Rec* 118: 44-48.

SALIKI, J.; DUBOVI, E. 2004. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Clin. Food. Anim.* 20: 69-83.

SCHIRRMAYER, H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K.; HOFFMANN, B.; BEER, M. 2004. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 85: 3647-3652.

STÅHL, K.; KAMPA, J.; ALENIUS, S.; PERSSON WADMAN, A.; BAULE, C.; AIUMLAMAI, S.; BELÁK, S. 2007. Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus--implications for BVD control and for the safety of biological products. *Vet. Res.* 38: 517-523.

STÅHL, K.; BENITO, A.; FELMER, R.; ZUÑIGA, J.; REINHARDT, G.; RIVERA, H.; BAULE, C.; MORENO-LÓPEZ, J. 2009. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Perú and Chile. *Pesqu. Vet Bras.* 29: 41-44.

STALDER, H. P.; MEIER, P.; PFAFFEN, G.; WAGECK-CANAL, C.; RÜFENACHT, J.; SCHALLER, P.; BACHOFEN, C.; MARTI, S.; VOGT, H. R.; PETERHANS, E. 2005. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 72: 37-41.

TADICH, N.; NETTLETON, P. MORGAN, K.; HODGSON, A.; MACAULAY, R.; REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S. 1998. Seroprevalencia de border disease en 22 ovejerías del sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 30: 191-196.

THABTI, F.; LETELLIER, C.; HAMMAMI, S.; PÉPIN, M.; RIBIÈRE, M.; MESPLÈDE, A.; KERKHOF, P.; RUSSO, P. 2005. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch. Virol.* 150: 215-229.

THOMSON, R.G.; SAVAN, M. 1963. Studies on virus diarrhea and mucosal disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.* 27: 207-214.

VILČEK, Š.; NETTLETON, P. F.; PATON, D. J.; BELÁK, S. 1997. Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.* 78: 725-735.

VILČEK, S.; PATON, D.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEGA, S.; SCICLUNA, M.; PALFI, V. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146: 99–115.

VILČEK, Š.; RIDHPATH, J.F.; VAN CAMPEN, H.; CAVENDER, J.L.; WARG, J. 2005. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res.* 108: 187-193.

WENTZ, P.; BELKNAP, E.; BROCK, K.; COLLINS, J.; PUGH, D. 2003. Evaluation of bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223: 223–228.

XUE, W.; BLECHA, F.; MINOCHA, H.C. 1990. Antigenic variations in bovine viral diarrhea viruses detected by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 28(8): 1688-1693.

YU, H.; GRASSMANN, C.W.; BEHRENS, S.E. 1999. Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J. Virol.* 73: 3638–3648.

YU, H.; ISKEN, O.; GRASSMANN, C.W. 2000. A stemloop structure formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J Virol* 74:5825–5835.

ZHANG, G.; FLICK-SMITH, H.; MCCAULEY, J.W. 2003. Differences in membrane association and sub-cellular distribution between NS2-3 and NS3 of bovine viral diarrhea virus. *Virus Res.* 97: 89–102.

ANEXOS

ANEXO Nº 1. Títulos virales correspondientes a ocho mediciones de cada periodo de la cinética de multiplicación viral, de todos los aislados del VDVB utilizados en este estudio correspondientes a los subgrupos genómicos 1b, 1e y 2a, obtenidos de camélidos sudamericanos.

AISLADO	Repetición	HORAS INCUBACION									
		3 horas	6 horas	9 horas	12 horas	15 horas	18 horas	21 horas	24 horas	30 horas	36 horas
A390 VDVB-1b	1	2,30103	2,30103	2,30103	2,30103	2,30103	2,80103	3,30103	3,30103	3,80103	4,30103
	2	2,30103	2,30103	2,30103	2,30103	2,30103	2,80103	3,30103	3,30103	3,80103	4,80103
	3	2,80103	2,80103	2,30103	2,30103	2,80103	2,80103	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103
	4	2,80103	2,80103	2,30103	2,30103	2,80103	2,80103	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103
	5	2,80103	2,80103	2,80103	2,80103	2,80103	2,80103	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103
	6	2,80103	2,80103	2,80103	3,30103	2,80103	2,80103	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103
	7	3,30103	2,80103	3,30103	3,30103	3,30103	3,30103	3,80103	3,80103	4,30103	5,30103
	8	3,30103	3,30103	3,30103	3,30103	3,30103	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103	5,30103
A474 VDVB-1b	1	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	2,80103
	2	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	3,30103
	3	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,30103
	4	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	3,30103	3,30103
	5	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	2,80103	3,30103	3,80103
	6	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	3,30103	3,80103	3,80103
	7	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	2,30103	2,30103	3,80103	3,80103	3,80103
	8	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	2,30103	2,80103	3,80103	4,30103	3,80103
A2 VDVB-1e	1	2,80103	2,80103	2,80103	3,30103	4,80103	4,80103	5,30103	5,30103	5,80103	6,30103
	2	3,30103	2,80103	2,80103	3,80103	4,80103	4,80103	5,30103	5,30103	5,80103	6,30103
	3	3,30103	3,30103	2,80103	3,80103	4,80103	4,80103	5,80103	5,80103	6,30103	6,80103
	4	3,30103	3,30103	2,80103	3,80103	4,80103	4,80103	5,80103	5,80103	6,30103	6,80103
	5	3,30103	3,30103	3,80103	3,80103	4,80103	4,80103	5,80103	5,80103	6,30103	7,30103
	6	3,30103	3,80103	3,30103	3,80103	4,80103	5,30103	5,80103	6,30103	6,80103	7,30103
	7	3,30103	3,80103	3,30103	3,80103	4,80103	5,30103	5,80103	6,30103	6,80103	7,30103
	8	3,80103	3,80103	3,80103	4,30103	5,30103	5,80103	5,80103	6,30103	6,80103	7,30103
A290 VDVB-1e	1	2,30103	2,30103	2,30103	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103	4,30103	5,80103	6,30103
	2	2,30103	2,30103	2,30103	3,30103	4,30103	4,80103	4,80103	4,30103	6,30103	6,30103
	3	2,80103	2,30103	2,30103	3,30103	4,30103	4,80103	4,80103	4,80103	6,30103	6,80103
	4	2,80103	2,80103	2,30103	3,30103	4,30103	5,30103	4,80103	4,80103	6,30103	6,80103
	5	2,80103	2,80103	2,80103	3,80103	4,80103	5,30103	5,30103	5,30103	6,30103	6,80103
	6	3,30103	2,80103	3,30103	3,80103	4,80103	5,30103	5,30103	5,30103	6,30103	6,80103
	7	3,30103	2,80103	3,80103	3,80103	5,30103	5,80103	5,80103	5,80103	6,80103	7,30103

	8	3,30103	2,80103	3,80103	3,80103	5,30103	5,80103	5,80103	5,80103	6,80103	7,80103
A502 VDVB-1e	1	2,30103	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103	5,30103
	2	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	3,30103	4,30103	4,30103	4,80103	5,80103
	3	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,80103	4,30103	4,30103	4,80103	5,80103
	4	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103	4,80103	5,80103
	5	1,30203	1,30203	2,30103	1,30203	3,30103	4,30103	4,30103	4,80103	4,80103	5,80103
	6	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,80103	4,30103	4,80103	4,80103	5,30103	5,80103
	7	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,80103	4,80103	5,30103	4,80103	5,30103	6,30103
	8	1,30203	2,30103	1,30203	2,80103	3,80103	4,80103	5,30103	5,30103	6,30103	6,30103
LL827 VDVB-1e	1	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103	4,30103
	2	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103	4,80103
	3	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103	4,80103
	4	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,80103	4,30103	5,30103	5,30103
	5	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	4,30103	4,30103	4,30103	5,30103	5,30103
	6	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	3,80103	4,30103	4,80103	5,30103	5,30103
	7	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	4,80103	4,80103	4,80103	5,30103	5,30103
	8	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	4,80103	4,80103	5,30103	5,80103	5,80103
LL1087 VDVB-1e	1	2,30103	2,80103	2,30103	3,80103	5,30103	5,30103	5,30103	5,80103	5,80103	6,30103
	2	2,30103	2,80103	2,80103	3,80103	5,30103	5,30103	5,30103	5,80103	5,80103	6,30103
	3	2,80103	2,80103	2,80103	3,80103	5,30103	5,30103	5,80103	5,80103	6,30103	6,30103
	4	2,80103	2,80103	2,80103	3,80103	5,30103	5,80103	5,80103	6,30103	6,30103	6,80103
	5	2,80103	2,80103	3,30103	3,80103	4,80103	5,80103	5,80103	6,30103	6,30103	6,80103
	6	2,80103	2,80103	3,30103	4,30103	4,80103	5,80103	5,80103	6,30103	6,30103	6,80103
	7	2,80103	3,30103	3,30103	4,30103	4,80103	5,80103	5,80103	6,30103	6,80103	6,80103
	8	2,80103	3,30103	3,30103	4,30103	4,80103	6,30103	6,30103	6,30103	6,80103	7,30103
LL1723 VDVB-1e	1	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	2,30103	3,30103	3,30103	3,80103	4,80103
	2	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	3,30103	3,30103	3,80103	3,80103	4,80103
	3	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103
	4	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,30103	4,30103	4,30103	4,80103
	5	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103	4,80103
	6	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,80103	4,30103	5,30103	4,80103
	7	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	4,30103	4,30103	4,30103	5,80103	4,80103
	8	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,80103	4,30103	4,80103	4,30103	5,80103	5,30103
A27 VDVB-2a	1	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	2,80103	2,30103	2,80103	3,80103	4,30103
	2	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	2,80103	2,80103	3,30103	4,30103	4,30103
	3	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	2,80103	2,80103	3,30103	4,30103	4,80103
	4	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	3,30103	3,30103	3,80103	4,30103	5,30103
	5	2,30103	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	3,80103	3,80103	4,30103	4,80103	5,30103
	6	2,30103	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,80103	3,80103	4,30103	4,80103	5,80103
	7	2,30103	2,30103	1,30203	1,30203	3,30103	4,30103	3,80103	4,30103	4,80103	5,80103
	8	2,80103	2,80103	2,30103	1,30203	3,80103	4,80103	4,30103	4,80103	5,30103	5,80103

LL626 VDVB-2a	1	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	3,30103	3,30103	4,30103	4,30103
	2	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,30103	3,30103	4,30103	4,30103
	3	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,30103	3,30103	4,80103	4,80103
	4	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,30103	3,80103	4,80103	4,80103
	5	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103	4,80103
	6	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	3,30103	3,80103	4,80103	5,30103	5,30103
	7	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,80103	4,30103	4,80103	5,80103	5,30103
	8	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	4,30103	4,80103	5,30103	5,80103	5,30103
LL794 VDVB-2a	1	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	2,80103	2,80103
	2	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	3,30103	2,80103
	3	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,30103	3,30103
	4	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,30103	3,30103	3,30103
	5	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	3,80103	3,30103	3,30103
	6	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	3,80103	3,80103	3,80103
	7	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,80103	3,80103	3,80103	3,80103
	8	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	1,30203	2,30103	2,80103	3,80103	3,80103	4,30103

Gráfico 9. Variables de crecimiento de aislados correspondientes al genotipo VDVB-1b.

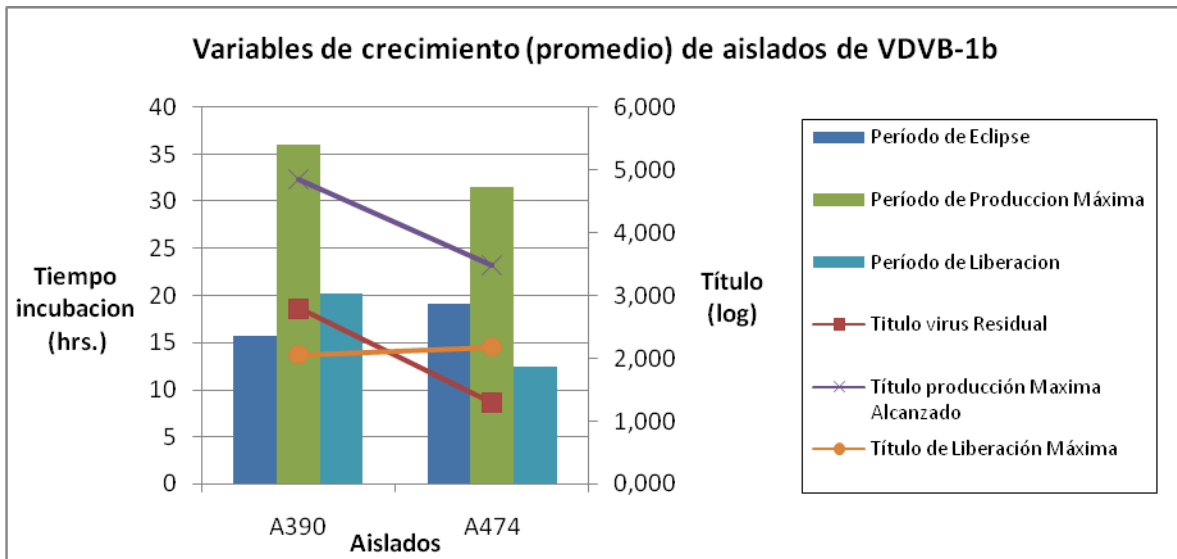


Gráfico 10. Variables de crecimiento de aislados correspondientes al genotipo VDVB-1e

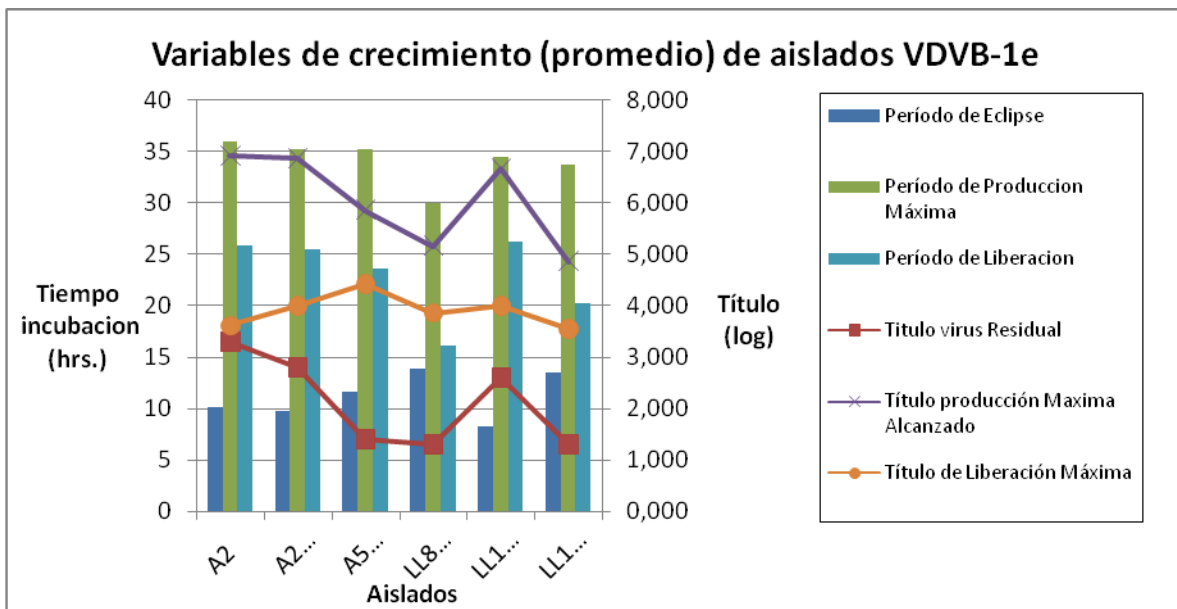


Gráfico 11. Variables de crecimiento de aislados correspondientes al genotipo VDVb-2a

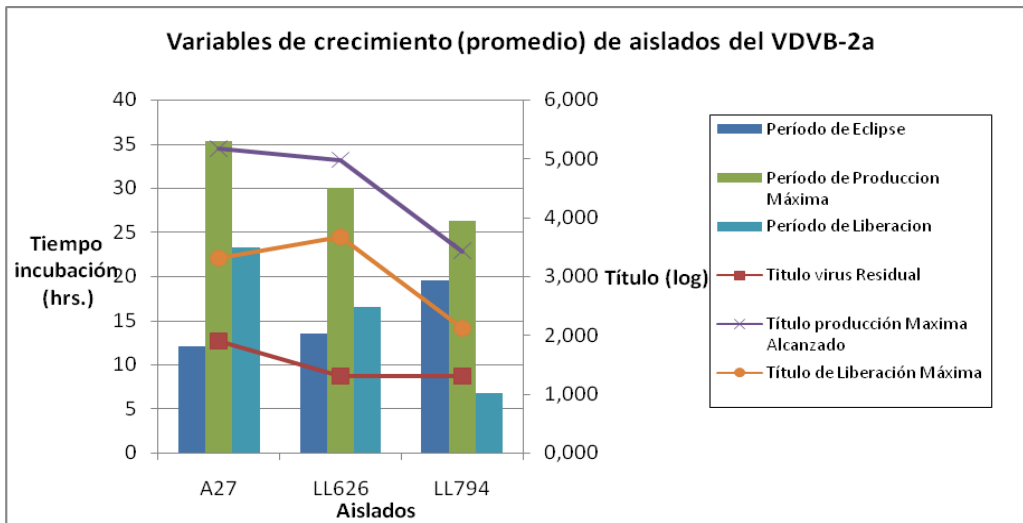


Gráfico 12. Promedio de las variables de crecimiento correspondientes a los genotipos VDVb-1b, VDVb-1e y VDVb-2a utilizados en este estudio.

