



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



**VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLADOS CHILENOS  
DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA POR FILOGENIA  
MOLECULAR DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA  
GLICOPROTEÍNA VIRAL E2**

**FELIPE INOSTROZA FUENTES**

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

**PROFESOR GUÍA: JOSÉ PIZARRO LUCERO**

**MEMORIA DE TÍTULO FINANCIADA POR PROYECTO FONDECYT 1060581**

**SANTIAGO, CHILE  
2009**

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



VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLADOS CHILENOS DEL  
VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA POR FILOGENIA  
MOLECULAR DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA  
GLICOPROTEÍNA VIRAL E2

**FELIPE INOSTROZA FUENTES**

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

NOTA FINAL:.....

FIRMA

PROFESOR GUÍA	: JOSÉ PIZARRO LUCERO	.....
PROFESOR CONSEJERO	: MARÍA. ORFELIA CELEDÓN	.....
PROFESOR CONSEJERO	: LUIS MORAGA	.....

SANTIAGO, CHILE  
2009

**INDICE**

## RESUMEN

## SUMMARY

1. INTRODUCCION	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 ENFERMEDAD	6
2.2 VIRUS	11
2.3 VARIABILIDAD GENÉTICA, ANTIGÉNICA Y BIOLÓGICA DEL VDVB	12
2.4 VIRULENCIA DEL VDVB	14
2.5 DIAGNÓSTICO DEL VDVB	18
2.6 CONTROL DEL VDVB	20
2.7 SITUACIÓN EN CHILE DEL VDVB	23
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1 MUESTRAS	
4.2 CULTIVOS DE CELULAS MDBK	
4.3 MULTIPLICACION VIRAL	
4.4 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD) DEL VDVB	
4.5 AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DE LA REGION E2 DEL GENOMA VIRAL	
4.6 SECUENCIACION DE LA REGION E2 DEL GENOMA DEL VDVB	
4.7 FILOGENIA MOLECULAR DE LA REGIÓN E2 DEL GENOMA DEL VDVB	
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSIÓN	37
7. CONCLUSIONES	41
8. BIBLIOGRAFÍA	42

## RESUMEN

El Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) es el agente causal del complejo Diarrea Viral Bovina / Enfermedad de las Mucosas (DVB/EM), que afecta productiva y reproductivamente al bovino, provocando grandes pérdidas económicas en la industria bovina mundial. El virus se presenta en todo el mundo, con prevalencias que van del 50 al 90%, diseminándose vía horizontal y vertical. En las infecciones prenatales se puede observar muerte fetal, momificación, aborto, alteraciones teratogénicas o generación de animales persistentemente infectados (PI); y en las infecciones posnatales, generalmente cursa en forma subclínica, pero también hay problemas reproductivos, inmunosupresión y cuadros más severos (incluso letales) como la diarrea viral bovina, enfermedad de las mucosas y síndrome hemorrágico.

El VDVB presenta una gran variabilidad genómica, antigénica y biológica. El VDVB se clasifica en dos genogrupos o genotipos: el genotipo VDVB1 (con actualmente 15 subgrupos) y el genotipo VDVB2. Antigénicamente, aunque presenta sólo un serotipo tiene una gran variabilidad antigénica. Biológicamente presenta dos biotipos: biotipo citopático (cp) y no citopático (ncp) y diversos estudios evidencian la presencia de virus de distinta virulencia.

En esta memoria de título se determinó la variabilidad genética de aislados chilenos del VDVB por filogenia molecular de la región E2 del genoma viral. Para ello, se analizaron genéticamente virus obtenidos desde animales con signología sospechosa de infección por VDVB, como así también de animales aparentemente normales, que en su conjunto provenían de la Región Metropolitana, VIII y X regiones. También se analizaron algunos virus aislados entre los años 1993-2001, que se mantenían guardados a -20°C.

De dieciocho virus analizados, catorce pertenecen al genotipo VDVB-1 y cuatro al genotipo VDVB-2. En los virus del genotipo VDVB-1, 6 pertenecen al subgrupo 1a, 7 al subgrupo 1b, y 1 al subgrupo 1e. En los virus del genotipo VDVB-2, todos corresponden al período 1993-2001, no siendo aislado el VDVB-2 en las muestras posteriores al 2001.

Esto concluye que el perfil genético de los aislados virales chilenos del VDVB analizados en esta memoria presenta una alta variabilidad, distinto a lo reportado en el estudio anterior, pero muy similar al perfil genético reportado en Argentina.

## SUMMARY

The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is the causative agent of the complex bovine viral diarrhoea / mucosal disease (BVD/MD) that affects the bovine productively and reproductively, causing great economic losses in the bovine industry. The virus is present worldwide, with prevalences between 50 to 90%, with vertical and horizontal transmission. In pregnant infections, death, mummification, abortion, and teratogenic alterations or generation of animals persistently infected (PI) can be observed; and in non-pregnant infection, generally it courses subclinically, but can also cause reproductive problems, immunosuppression, bovine viral diarrhoea, mucosal disease and haemorrhagic syndrome.

The BVDV shows a high genomic, antigenic and biological variability. The BVDV can be segregated in two genogroups or genotypes: the genotype VDVB1 (with 15 subgroups) and the genotype VDVB2. Antigenically, the BVDV has one serotype, but shows a high variability. Biologically it presents two biotypes: cytopathic (cp) and non-cytopathic (ncp) and diverse studies show the presence of virus of different virulences.

The purpose of this study was to know the genetic variability of Chilean isolates of the BVDV by molecular phylogeny of the E2 region of the viral genome. The viruses were collected from bovines with signology suspicious of infection by BVDV, and also from apparently healthy animals from the Metropolitan Region, VIII and X regions from Chile. Some viruses isolated between the years 1993-2001 were also included into the genetic analysis.

Of eighteen viruses analyzed, fourteen belong to genotype VDVB-1 and four to genotype BVDV-2. Among the genotype BVDV -1 viruses, 6 belong to the sub-group 1a, 7 to the sub-group 1b, and 1 to the sub-group 1e. Among the genotype BVDV -2 viruses, all were isolated between 1993-2001. VDVB 2 was not isolated in samples taken after 2001.

It is concluded that the genetic profile of the viral Chilean isolates of the BVDV analyzed in this study show a high variability, different from the reported in one previous study, but very similar to the genetic profile reported in Argentina.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) es el agente etiológico de una gran diversidad de síndromes, los que en su conjunto son responsables de grandes pérdidas económicas en el ganado bovino a nivel mundial. Las altas pérdidas se deben a que el virus afecta tanto parámetros productivos como reproductivos: producción de leche, rendimiento reproductivo, crecimiento, incidencia en otras enfermedades, mortalidad de terneros, etc.

El virus además de afectar a los bovinos, también tiene la capacidad de infectar a otras especies, tales como porcinos, ovinos, caprinos, camélidos sudamericanos y una amplia variedad de rumiantes silvestres. La transmisión horizontal del virus ocurre por diversas vías, pero también es capaz de hacer infección vertical, generando animales portadores inmunotolerantes persistentemente infectados con el virus (animales PI), principales diseminadores de la infección en los animales, situación clave para el adecuado control de la enfermedad.

El virus presenta una alta variabilidad, tanto a nivel genómico, antigénico y biológico. El análisis genético del virus ha demostrado la presencia de distintos genotipos y grupos, algunos de ellos presentes sólo en ciertas zonas geográficas y otros distribuidos en forma cosmopolita.

En Chile, el virus se aisló por primera vez en 1985 en la zona sur del país. El virus se encuentra ampliamente diseminado en el país, con una prevalencia serológica de un 69,2% en la Novena Región de la Araucanía y la Décima Región de los Lagos y de un 59,7% y 86% en bovinos de leche y de carne de la Región Metropolitana de Santiago, respectivamente. Los virus chilenos presentan una alta variabilidad genómica, antigénica y biológica, identificándose la presencia de los genotipos VDVB1 y VDVB2 y los subgrupos 1a, 1b y 1j en el ganado bovino nacional.

En esta memoria de título se determinó la variabilidad genética de aislados chilenos del VDVB por filogenia molecular de la región codificante de la glicoproteína E2 del VDVB.

## **2. REVISION BIBLIOGRAFICA**

El Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) es el agente causal del complejo Diarrea Viral Bovina/Enfermedad de las Mucosas (DVB/EM), encontrándose diseminado en todo el mundo con prevalencias que fluctúan entre un 50% a un 90% (Baker, 1990; Houe, 1999). Actualmente, se reconoce al VDVB como una de las principales causas de pérdidas económicas en el ganado bovino, debido al efecto detrimental en la producción láctea, el rendimiento reproductivo, el retardo en el crecimiento, el aumento de incidencia de otras enfermedades, el aumento de mortalidad de los terneros, etc. (Houe, 1999).

En Estados Unidos se estima que las pérdidas económicas provocadas por el VDVB en la industria del bovino norteamericana estaría entre unos US\$ 10-57 millones / millón de terneros (Houe, 2003). En Nueva Zelanda se estiman pérdidas de NZ\$ 87 por vaca / año en los rebaños lecheros afectados, y pérdidas superiores a los NZ\$ 44 millones / año en la industria lechera neozelandesa, en base a un 14,6 % de rebaños afectados (Heuer *et al.*, 2007).

### **2.1 ENFERMEDAD**

La infección con el VDVB puede ser asintomática o generar una gran diversidad de cuadros clínicos (Corapi *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1994). La patogénesis de estos cuadros, también llamados síndromes, está determinada por diversos factores, entre los cuales están la ocurrencia de viremia en el animal afectado, la capacidad del virus de deprimir el sistema inmune del animal infectado, realizar infecciones transplacentarias, inducir inmunotolerancia en la etapa prenatal (animales PI) o inmunocompetencia en etapas postnatales (Radostits y Littlejohns, 1988).

Si bien, en un comienzo la infección viral se asoció al sistema digestivo del animal, el virus también es capaz de provocar problemas respiratorios, reproductivos y síndromes hemorrágicos, además de tener un rol importante en diversas patologías dado su efecto inmunodepresor (Baker, 1990; Brownlie, 1990; Pellerin *et al.*, 1994). Estudios recientes en animales PI clínicamente sanos, demuestran que secreciones nasales, epitelio, y leucocitos infectados en secreciones respiratorias serían las fuentes más probables para el contagio a otros animales del BVDV, además de predisponer al ganado PI a infecciones microbianas secundarias (Confer *et al.*, 2005).

El virus se transmite vía horizontal y vertical. En el primer caso (infección postnatal), la infección ocurre a través de la inhalación o ingestión de saliva, secreciones óculo-nasales o uterinas, leche, semen, heces, orina y sangre infectadas. También ocurre por la aplicación

parenteral de productos biológicos contaminados (generalmente suero fetal bovino ocupado en la producción de vacunas), picaduras de insectos hematófagos, empleo de agujas e implementos contaminados, palpación rectal, inseminación e implantación de embriones procedentes de animales infectados y a través de cualquier implemento contaminado que tome contacto con las mucosas de un animal susceptible (Baker, 1987; Makoschey *et al.*, 2003; Gard *et al.*, 2007).

En la transmisión vertical (infección prenatal), el virus pasa desde la madre al embrión y la patología dependerá del tiempo de gestación que tenga el feto al momento de la infección y de la cepa viral infectante (Baker, 1990; Brownlie, 1990).

### SÍNDROMES CLÍNICOS EN INDIVIDUOS CON INFECCIÓN PRE-NATAL

La consecuencia más importante que tiene la infección de un animal en gestación, está relacionada con la capacidad del virus de cruzar la barrera placentaria. Ésto provoca una amplia gama de anormalidades, dependiendo del estado de desarrollo fetal en el momento de la infección y del biotipo de la cepa infectante (Duffel y Harkness, 1985; Baker, 1990; Brownlie, 1990).

#### A. - Infección en animales entre 0 a 100 días de gestación:

En este período se observa muerte fetal, seguido de aborto o momificación, pudiendo ocurrir la expulsión fetal varios meses post – infección (Baker, 1990; Brownlie, 1990). Si la infección es por el biotipo no citopático (NCP) del VDVB, afecta la implantación, en cambio si es del biotipo citopático (CP), se ve afectada la integridad del útero o del embrión (Fray *et al.*, 2000a). Todo esto se refleja en repetición de celo, aumento del índice por concepción y del lapso parto-preñez (Perdrizet *et al.*, 1987; Galleti – Vernazzani, 1997).

#### B. - Infección de animales entre 100 a 150 días de gestación:

Debido a que en este período el sistema nervioso está terminando la etapa de organogénesis se observan diversas alteraciones teratogénicas, como: microcefalia, hipoplasia cerebelar, hidranecefalia, defectos de la mielinización de la médula espinal, cataratas, degeneración retinal, neuritis óptica, microftalmia, y otros como aplasia tímica, hipotricosis, alopecia, braquignatismo, crecimiento retardado e hipoplasia pulmonar (Roeder *et al.*, 1986; Radostits y Littlejohns, 1988; Baker, 1990).



Cuando un feto es infectado con un aislado NCP del VDVB antes de los 125 días de gestación, la cepa viral es reconocida como un antígeno propio y el feto se vuelve portador inmunotolerante (PIT). Los animales PI son inmunotolerantes sólo contra los determinantes antigénicos del virus que indujo la tolerancia, reaccionando contra cepas antigénicamente distintas. Estos animales pueden morir a los pocos días de vida, nacer débiles, presentar retraso en el desarrollo o permanecer clínicamente normales. Independientemente de esto, eliminan altas cantidades de virus por sus secreciones, inclusive portando anticuerpos maternos (Duffel y Harkness, 1985; Roeder *et al.*, 1986; Browlie, 1990).

Estos animales son inmunocompetentes frente a otros patógenos, siendo incluso capaces de desarrollar anticuerpos contra vacunas vivas atenuadas de VDVB, de cepas heterólogas del virus, es decir cepas diferentes antigénicamente a la cepa viral que indujo la inmunotolerancia (Howard, 1990).

#### C. - Infección de animales con más de 150 días de gestación:

Por ser animales inmunocompetentes, raramente la infección viral provoca malformaciones congénitas, naciendo generalmente normales e incluso antes de la ingestión de calostro ya presentan anticuerpos neutralizantes contra VDVB (Baker, 1990; Fray *et al.*, 2000b)

### SINDROMES CLINICOS EN INDIVIDUOS CON INFECCION POST-NATAL

#### A. - Cuadro Subclínico:

La mayoría de las infecciones en animales adultos, susceptibles e inmunocompetentes, corresponden a este tipo de cuadro (70–90%). El animal presenta signos como fiebre transitoria y leucopenia seguida de la aparición de anticuerpos neutralizantes específicos a las 2–3 semanas postinfección, alcanzando su nivel más alto entre las 8-10 semanas post infección (Radostits y Littlejohns, 1988; Baker, 1990; Nettleton y Entrican, 1995). En condiciones naturales esta infección es causada por un virus no citopático (NCP) y es la consecuencia más común de la infección viral (Bolin, 1990).

### B. - Diarrea Viral Bovina (DVB):

La DVB es una infección aguda del ganado inmunocompetente seronegativo, que se presenta generalmente en animales entre 6 y 24 meses. Puede causar enfermedad en terneros menores de 6 meses que no han recibido una adecuada inmunidad pasiva, presentándose como una enteritis severa llegando incluso a ser fatal.

El período de incubación del virus es de 5 a 7 días, luego de lo cual se manifiesta fiebre transitoria, leucopenia y viremia durante 15 días, siendo el virus excretado en baja concentración. Anticuerpos neutralizantes generalmente son detectados en el suero 3 a 4 semanas después de la infección y probablemente persisten por años (Radostits y Littlejohns, 1988; Baker, 1990). Los animales presentan depresión, inapetencia, descarga óculo-nasal y ocasionalmente, lesiones orales caracterizadas por erosiones o ulceraciones oscuras. A pesar de que los animales susceptibles pueden presentar diarrea con alta morbilidad, finalmente se recuperan presentando una baja o nula mortalidad sin secuelas posteriores. También se observa disminución de la producción láctea (Ames, 1986; Browlie, 1990; Baker, 1990).

### C. - Enfermedad de las Mucosas (EM):

La enfermedad se presenta más frecuentemente entre los 6 meses y los 2 años de edad y se caracteriza por una baja morbilidad y alta mortalidad (Ames, 1986; Brownlie, 1990).

La enfermedad se presenta cuando un animal persistentemente infectado (portador inmutolerante, PIT) se sobreinfecta con una cepa antigénicamente idéntica o muy similar al virus que ya tiene el animal, pero de biotipo CP (Brownlie *et al.*, 1984; Smirnova *et al.*, 2008).

La enfermedad se manifiesta en forma aguda siendo 100% letal (Baker, 1990). Los animales afectados presentan fiebre, depresión, anorexia, debilidad y en caso de hembras lactantes se produce una disminución en la producción de leche (Radostits y Littlejohns, 1988). En la cavidad bucal se observa salivación y lesiones erosivas llegando a producir necrosis. También se presentan erosiones en zona nasal, faringe, vulva, pezones y glándula mamaria (Baker, 1987). El animal también puede presentar cojera por erosiones en la hendidura interdigital, que si se encuentra asociado a coronitis y laminitis puede llevar al postramiento del animal.

Hematológicamente se evidencia una severa leucopenia, neutropenia y trombocitopenia. La distribución de las lesiones se relaciona con la afinidad del virus de producir necrosis en tejido

epitelial gastrointestinal, tegumentario y respiratorio, e incluso endotelio de los vasos sanguíneos (Baker, 1990).

La forma crónica de la enfermedad se presenta cuando un animal PI se sobreinfecta con una cepa CP, antigénicamente similar (pero no idéntica) al virus NCP que ya infectaba al animal (cepa heteróloga). Aunque la enfermedad es de curso más lento (semanas o meses) también finalmente, provoca la muerte del individuo (Baker, 1990). Se observa inapetencia, diarreas continuas o intermitentes y emaciación progresiva, pelaje hirsuto, deformación de las uñas y lesiones erosivas cubiertas de escaras en periné, escroto, orificio prepucial, vulva, cara interna de los miembros y hendidura digital. Los animales finalmente mueren por inanición (Radostits y Littlejohns, 1988).

#### D. -Infección Venérea y Falla Reproductiva:

En el semen de toros permanente o transitoriamente infectados, el virus provoca alteraciones tanto al macho como la hembra. En el macho genera alteraciones en la calidad del semen, provocando anomalías morfológicas de los espermios y disminuyendo su motilidad. En la hembra el virus afectaría la calidad de los oocitos ovulados, por atresia y disminución de la viabilidad (Baker, 1987; Fray *et al.*, 2000a; Gard *et al.*, 2007)

Estas alteraciones determinan que la infección viral provoque fallas en la concepción, manifestándose a través de un aumento de la repetición del celo, que se visualiza por un aumento en la relación servicios y concepción. El problema al parecer sería transitorio hasta que se desarrolla una adecuada respuesta inmune contra el virus (Baker, 1990).

#### E. - Inmunosupresión:

El virus es capaz de ejercer un efecto inmunodepresor potenciando la acción y daño de otros patógenos (sinergismo) tales como el virus parainfluenza 3 (PI3), el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), coronavirus, rotavirus, *pasteurella* spp, *salmonella* spp, coccidias, etc. (Radostits y Littlejohns, 1988; Baker, 1990).

## F. - Síndrome Hemorrágico (SH):

Este cuadro es de aparición más reciente, con la descripción de los primeros casos en la década del '90 en Norteamérica (Corapi *et al.*, 1990; Bolin y Ridpath, 1992; Pellerin *et al.*, 1994). Este síndrome provoca una alta mortalidad independiente de la edad del animal infectado.

Los signos clínicos descritos son una diarrea hemorrágica, fiebre, epistaxis, sangramiento en los sitios de inyección y una severa trombocitopenia, que explicaría las petequias y equimosis diseminadas por gran parte de las cavidades y órganos torácicos y abdominales. Esto podría deberse a un efecto directo del virus sobre las plaquetas circulantes, más que a una disminución de la blastogénesis a nivel de la médula ósea (Corapi *et al.*, 1990).

## **2.2 VIRUS**

El VDVB pertenece al género Pestivirus de la familia *Flaviviridae* junto al virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC) y al virus de la Enfermedad de la Frontera (VEF) (Murphy *et al.*, 1995). La partícula viral posee un diámetro de 30 a 40 nm, una envoltura lipídica y un genoma constituido por una hebra de ARN de polaridad positiva de un tamaño de 12,5 Kb (Boulangier *et al.*, 1992).

El VDVB es estable a una temperatura de -10°C y en un rango de pH entre 3 y 9. Sin embargo, en el medio ambiente, en orina o material fecal, su viabilidad no se mantiene por más de 14 días. El virus es sensible a desinfectantes como clorhexidina, yodóforos, hipoclorito y aldehídos (Duffel y Harkness, 1985).

El genoma tiene en su extremo 5' una región no codificante (5'NCR) de 360–390 pb con una compleja estructura secundaria, luego presenta una región codificante para una poliproteína de unos 4000 aminoácidos (ORF) y finalmente en su extremo 3' tiene una región no codificante de unos 200 bases, sin el extremo poliadenilado (Murphy *et al.*, 1995).

La poliproteína sintetizada es procesada co- y pos-traduccionalmente por proteasas celulares y virales generando 11 ó 12 proteínas maduras (Lackner *et al.*, 2004; Lindenbach y Rice, 2001). La primera proteína codificada es Npro, una autoproteasa que precede a la región que codifica para las proteínas estructurales, las que corresponden a 1/3 de la poliproteína. Estudios recientes indican que Npro tendría la propiedad de bloquear específicamente la actividad del factor

regulador de Interferón (IRF-3), un factor de transcripción esencial para la activación del promotor de Interferón (Hilton *et al.*, 2006).

La primera proteína estructural codificada por el genoma viral es la proteína C, de 20 KDa que forma la nucleocápside viral. A continuación se encuentran las glicoproteínas virales Erns, E1 y E2 ubicadas en la envoltura lipídica del virión (Thiel *et al.*, 1991; Weiland *et al.*, 1999). Erns es una glicoproteína con actividad ribonucleasa, indispensable para el ciclo infeccioso viral. Para E1 y E2 se han identificado señales de unión a membranas (Meyers y Thiel, 1996). E2 es la proteína mayoritaria de la partícula viral y juega un rol preponderante en la respuesta inmune del huésped, ya que posee los epítopes críticos en la estimulación de la producción de anticuerpos neutralizantes (Xue *et al.*, 1990; Horzinek, 1990; Boulanger *et al.*, 1992).

Los 2/3 restantes de la poliproteína son proteínas no estructurales, éstas son: p7, NS2-3 (NS2, NS3), NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (Meyers y Thiel, 1996). Estudios recientes han intentado descifrar cual es la función de estas proteínas y se sugiere que NS3, NS4A, NS4B y NS5B tienen un papel esencial durante los pasos tempranos de la replicación viral, no así NS5A (Grassmann *et al.*, 2001). p7 posee una masa molecular de 6 a 7 KDa y hasta ahora no se le conoce función concreta (Harada *et al.*, 2000). NS3 tiene función de proteasa encargada de liberar las proteínas NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Tautz *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que NS4A es el cofactor de la proteasa NS3 (Xu *et al.*, 1997).

### **2.3 VARIABILIDAD GENÓMICA, ANTIGÉNICA Y BIOLÓGICA DEL VDVB**

El virus presenta una gran variabilidad genómica, manifestada a través de una alta frecuencia de mutaciones puntuales a través de todo el genoma viral y recombinaciones genómicas en el gen que codifica para la proteína viral NS2-3 (Meyers y Thiel, 1996).

Análisis genéticos han detectado diferencias de hasta un 40% en las secuencias nucleotídicas de algunas regiones genómicas de aislados del VDVB (Ridpath *et al.*, 1994). La región más conservada es la 5'NCR y la más variable es la región que codifica para la proteína E2 (Pellerin *et al.*, 1994). Al comparar las secuencias nucleotídicas de la región 5'NCR de distintos aislados del VDVB, éstos se han podido clasificar en dos genogrupos o genotipos: el genotipo VDVB1, que agrupa a las principales cepas de laboratorio (NADL, Singer, C24V, etc.) y aislados que provocan cuadros clínicos leves; y el genotipo VDVB2, que agrupa además de aislados de cuadros clínicos leves, a todos los aislados asociados al síndrome hemorrágico de los bovinos y aquellos que

provocan diarreas graves en animales adultos inmunocompetentes (Ridpath *et al.*, 1994; Pellerin *et al.*, 1994).

La distribución de los virus del genotipo VDVB1 es mundial, en cambio los virus del genotipo VDVB2 sólo se han reportado en Norteamérica, Sudamérica, Japón y algunos países de Europa (Alemania, Bélgica, Austria, Italia, Francia). A excepción de Norteamérica, el VDVB2 se encuentra muy poco diseminado en la población bovina, en comparación con los virus del genotipo VDVB1 (Ridpath, 2005; Jones *et al.*, 2001; Sakoda *et al.*, 1999; Wolfmeyer *et al.*, 1997; Couvreur *et al.*, 2002, Vilcek *et al.*, 2003; Luzzago *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2001). Debido a estos antecedentes al genotipo VDVB2 se le considera un virus emergente en el ganado bovino mundial.

Estudios filogenéticos han demostrado la existencia de grupos de virus genéticamente similares dentro de los genotipos VDVB1 y VDVB2 llamados subgrupos (Pellerin *et al.*, 1994; Becher *et al.*, 1997; Tajima *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2001). Dentro de estos subgrupos, hay agrupaciones de virus más similares aún, denominados "clusters". Actualmente se reconoce la existencia de 11 grupos genéticos del VDVB (Vilcek *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios recientes han identificado cuatro nuevos subgrupos dentro del genotipo VDVB1, el subgrupo "l" en Turquía y Francia (Jackova *et al.* 2008, Yesilbag *et al.*, 2008) el subgrupo "m" en China (Xu *et al.*, 2006) y los subgrupos "n" y "o" en Japón (Nagai *et al.*, 2008).

Al usar otras regiones del genoma viral para los estudios filogenéticos del virus, en general los resultados han confirmado la clasificación genética obtenida con la región 5'NCR, aunque algunas regiones del genoma permiten una mejor segregación de los virus en linajes, como por ejemplo la región codificante de la proteína E2 (Tajima, 2004; Vilcek *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2007).

La variabilidad genómica del virus se correlaciona en el comportamiento biológico y antigénico, lo que podría explicar las distintas patologías asociadas al virus (Bolin y Ridpath, 1992).

Antigénicamente el VDVB presenta un único serotipo, sin embargo, ensayos de neutralización viral (NV) con anticuerpos monoclonales y policlonales, han establecido una importante variabilidad antigénica entre los distintos aislados. Las mayores diferencias antigénicas se dan entre aislados del genotipo VDVB1 y VDVB2, lo que permite discriminar antigénicamente ambos genotipos (Corapi *et al.*, 1990; Xue *et al.*, 1990; Ridpath *et al.*, 1994; Pellerin *et al.*, 1994, Reddy *et al.*, 1995, Couvreur *et al.*, 2002).

Se ha observado que algunos anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer exclusivamente a los aislados virales de un genotipo (Ridpath *et al.*, 1994). Esto explicaría el por qué en Estados Unidos de Norteamérica, pese al uso de vacunas por mas de 30 años, el ganado bovino no es protegido eficientemente frente a las infecciones con el VDVB (Bolin, 1995; Van Oirschot *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 2002).

Biológicamente los aislados virales presentan dos biotipos, determinados según los efectos provocados por la infección viral en los cultivos celulares. El biotipo citopatogénico (CP) provoca redondeamiento y lisis de las células infectadas; en cambio, el biotipo no citopatogénico (NCP) no provoca alteraciones visibles en las células infectadas (Meyers y Thiel, 1996). Las cepas NCP del VDVB inhiben la síntesis de interferón alfa – beta en las células infectadas lo que impide la lisis celular, efecto producido por la glicoproteína viral Erns, a diferencia de las cepas CP que no inhiben la síntesis de interferón alfa – beta (Charleston *et al.*, 2001; Schweizer y Peterhans, 2001; Iqbal *et al.*, 2004). Sin embargo, estudios recientes indican que la infección aguda del VDVB biotipo NCP también induce respuesta de interferón en vacas preñadas y fetos (Smirnova *et al.*, 2008).

Investigaciones con cepas CP y NCP antigénicamente homólogas, han demostrado diferencias entre ellas en las características de la infección que llevan a cabo en los animales infectados. Así, animales infectados con cepas NCP generan una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes e infectan una amplia variedad de tejidos (tracto respiratorio, células sanguíneas, bazo, etc.), a diferencia de las cepas CP que generan menor cantidad de anticuerpos neutralizantes e infectan solo algunos tejidos, especialmente el tejido linfático del aparato digestivo (Lambot *et al.*, 1998).

Otra diferencia entre los biotipos se observa cuando infectan a células dendríticas y monocitos, observándose que el 90% de los monocitos infectados por el biotipo CP son destruidos, efecto que no se ve con el biotipo NCP (Glew *et al.*, 2003; Brackenbury *et al.*, 2003).

## **2.4 VIRULENCIA DEL VDVB**

Las cepas de campo del VDVB se ha visto que presentan distintas virulencias. Así, mientras una infección de un animal adulto inmunocompetente con una cepa de baja virulencia cursa normalmente en forma subclínica, la infección con una cepa de alta virulencia provoca un cuadro clínico que en algunos casos puede tener una alta letalidad (Baker, 1990; Corapi *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1994).

Investigaciones realizadas con cepas NCP de distintas virulencias del VDVB, muestran diferencias en el tropismo celular. Así, las cepas asociadas al síndrome hemorrágico son capaces de multiplicarse en trombocitos afectando sus niveles en sangre, capacidad que no presentan los otros aislados del VDVB (Corapi *et al.*, 1990). Animales PI infectados con virus que no provocan el SH si bien presentan el virus en plaquetas, no se observa alteración de la función plaquetaria ni tampoco disminución significativa de sus niveles (Walz *et al.*, 2005).

También se ha visto que al infectar experimentalmente animales con cepas CP de distinta virulencia de los genotipos VDVB1 y VDVB2, las cepas más virulentas son las que generan la mayor viremia en los animales infectados, lo que estaría dado probablemente por una replicación más eficiente del virus en el animal infectado (Bolin y Ridpath, 1992; Walz *et al.*, 2001). Ahora bien, aunque ambos genotipos atacan los mismos tejidos, se observa que los aislados del genotipo VDVB2 hacen una mayor viremia que el VDVB1 (Walz *et al.*, 2001). Otros autores han observado que al infectar animales con cepas de distinta virulencia del VDVB2, la infección con cepas más virulentas también genera una mayor viremia, más prolongada y las lesiones en el sistema linfático y digestivo son más severas, sugiriendo diferencias en la capacidad de provocar daño en el tejido (Kelling *et al.*, 2002; Liebler – Tenorio *et al.*, 2002).

Estudios recientes realizados en glóbulos blancos circulantes (WBC) de origen bovino han llevado a postular la existencia de tres biotipos del VDVB: un biotipo no citopatogénico (sin efectos obvios en la viabilidad de células epiteliales ni linfoides), biotipo citopatogénico (muerte celular epitelial y linfoide dentro de las primeras 48 horas de la infección) y un nuevo biotipo linfocitopatogénico (sin efectos en células epiteliales, pero que provoca la lisis de células linfoides dentro de los primeros 5 días de la infección). Este biotipo linfocitopatogénico presenta una alta virulencia en infecciones agudas en animales infectados. El biotipo linfocitopatogénico no genera en las células los mismos marcadores moleculares producidos por el biotipo citopático (presencia de la proteína NS3 y alteración de la integridad de la célula). Esto sugiere que el efecto citopático provocado por este nuevo biotipo ocurre por un mecanismo diferente al del biotipo citopático del VDVB (Ridpath *et al.*, 2006). Trabajos realizados en una línea de células linfoides (BL3) indican que las células BL3 responden de una forma distinta a la infección con el biotipo NCP del BVDV dependiendo de la virulencia de la cepa. Algunas cepas de alta virulencia provocan muerte celular, pero por un mecanismo distinto a la apoptosis provocado por los virus citopáticos (Bendfeldt *et al.*, 2007)

Por otra parte, estudios realizados con cepas de distinta virulencia de VPPC han demostrado la existencia de diferencias en la liberación de la progenie desde la célula infectada,



donde a medida que aumenta la virulencia de la cepa, aumenta la razón viriones libres (extracelulares) / viriones asociados a células (intracelulares), lo que indicaría que una liberación más eficiente de la progenie viral desde las células infectadas haría a algunas cepas más virulentas (Mittelholzer *et al.*, 2000).

Si bien se conoce que el VDVB provoca abortos, hay antecedentes que llevan a pensar que el genotipo podría tener un rol importante en la capacidad del virus de provocar abortos. Evermann y Ridpath han reportado que en las infecciones ocurridas antes de los 100 días de gestación, los virus del genotipo VDVB2 son los que presentan mayor incidencia, seguido de los virus de los subgrupos VDVB1b y luego del subgrupo VDVB1a. Este orden se invierte cuando se evalúan las infecciones luego de los 100 días de gestación. Ahora, al evaluar el aspecto clínico, la mayor cantidad de abortos fueron asociados a las infecciones por los virus del genotipo VDVB2 (Evermann y Ridpath, 2002).

Por otra parte, se ha observado que los virus de los subgrupos VDVB1b y VDVB1d estarían asociados preferentemente a cuadros respiratorios (Baule *et al.*, 2001; Fulton *et al.*, 2002). Estas diferencias en la virulencia entre distintos aislados y entre subgrupos virales, hacen pensar que posiblemente existan caracteres genómicos conservados que se expresarían en algunos virus y explicarían estas diferencias en la virulencia viral.

La región 5'NCR del VDVB, la región más conservada del genoma viral, se ha visto que es crucial tanto para la replicación como para la traducción viral, y mutaciones en esta zona producen virus con una infectividad disminuida, sintetizando menos genoma y progenie viral, además de la formación de placas de infección más pequeñas (Becher *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000). Esta atenuación de la infectividad viral se ha visto tanto *in vitro* como *in vivo*, presentándose animales con una menor viremia y un cuadro clínico más leve (Makoschey *et al.*, 2004). Además, estudios realizados con cepas de campo de distinta virulencia han mostrado que su virulencia se asocia a diferencias en la eficiencia traduccional de la región 5'UTR (Topliff *et al.*, 2005).

La región 3'UTR también es importante para la multiplicación viral, específicamente a nivel de la replicación del ARN y la terminación de la traducción viral (Isken *et al.*, 2004). Estudios realizados en otros flavivirus han demostrado que mutaciones en esta región del genoma viral producen una atenuación de la virulencia viral asociada a una disminución de la eficiencia de la infección viral en cultivos celulares (Mandl *et al.*, 1998).

Con respecto a las proteínas, Npro es una autoproteasa que en el VPPC se ha visto que interfiere en la síntesis de interferón alfa/beta, aumentando la resistencia a la apoptosis (Ruggli *et al.*, 2003). En el VDVB ocurre algo similar, ya que estudios con una cepa de biotipo CP que expresa una Npro mutante, demuestran que la respuesta IFN alfa/beta es dependiente de la expresión de Npro, y no de la eficiencia replicativa viral. Además, utilizando un Npro mutante con falla en su capacidad catalítica se concluyó que la integridad estructural del dominio amino terminal de Npro es más importante que la actividad catalítica para suprimir la síntesis de IFN alfa/beta (Gil *et al.*, 2006).

Erns es una glicoproteína con actividad ribonucleasa, indispensable para el ciclo infeccioso viral, y en el VDVB inhibe la activación de beta interferón por ARN de doble hebra, mecanismo clave de la respuesta innata frente a las infecciones virales (Iqbal *et al.*, 2004).

La proteína viral E2 es fundamental en la respuesta inmune del hospedero, ya que posee los epítomos más importantes en la estimulación de la producción de anticuerpos neutralizantes (Xue *et al.*, 1990; Horzinek, 1990; Boulanger *et al.*, 1992). Investigaciones realizadas en el VPPC, demostraron que la glicoproteína E2 de una cepa atenuada fue responsable de una menor síntesis de progenie viral y placas de infección más pequeñas en cultivos celulares; además *in vivo* se evidenciaron los siguientes hechos: menor diseminación de la infección, menor replicación viral en los tejidos, menor viremia y un cuadro clínico más leve y corto que lo observado con la glicoproteína E2 de la cepa más virulenta (Risatti *et al.*, 2005).

El VDVB se multiplica eficientemente tanto en células de bovinos como de ovejas, pero el VEF (Virus de la Enfermedad de la Frontera) se multiplica eficientemente sólo en células de oveja; sin embargo, cuando se crea una quimera del VDVB, con la región codificante de E2 del VEF, este nuevo virus se multiplica eficientemente en células de riñón de oveja, pero experimenta una gran disminución en su capacidad de multiplicarse en células MDBK de origen bovino (Liang *et al.*, 2003). Esto demuestra que E2 tiene un rol importante en determinar el tropismo celular del VDVB.

En los virus NCP la proteína NS2-3 siempre se encuentra como una molécula única, distinto a lo que ocurre en los virus CP, en donde NS2-3 se encuentra parcialmente procesada en NS2 y NS3 junto a la NS2-3 (Meyers y Thiel, 1996). Sin embargo, estudios recientes indican que a tiempos tempranos de la infección viral, la proteína NS2-3 tiene la capacidad de auto-procesarse generando NS2 y NS3 tanto en los virus CP como NCP (Lackner *et al.*, 2004). La diferencia está en que a tiempos más tardíos de la infección viral, los virus NCP dejan de autoprocasar a NS2-3 cosa que no ocurre con los virus CP. La eficiencia de la síntesis del ARN depende del auto-procesamiento

de NS2-3, indicando que NS2-3 es importante para el control de la replicación y la patogenicidad del VDVB (Lackner *et al.*, 2004).

## **2.5 DIAGNÓSTICO DEL VDVB**

Dada la gran variedad de signos clínicos provocados por el VDVB, el diagnóstico de laboratorio se hace imprescindible, sobre todo para los animales inmunotolerantes (PI), por la importancia epidemiológica que ellos presentan (Duffel y Harkness, 1985).

Los métodos diagnósticos se orientan, como en todas las enfermedades virales a la detección del virus en el hospedador (diagnóstico virológico) y/o a la detección de la respuesta inmune del hospedador (diagnóstico serológico), según sean las necesidades del estudio. Sin embargo, tan importante como estos diagnósticos es conocer la biología del virus, y a su vez la naturaleza y duración de la respuesta inmune del hospedador.

### Aislamiento e identificación del VDVB en cultivos celulares:

El aislamiento viral es un método que busca multiplicar *in vitro* el virus presente en una muestra con el uso de un sistema biológico que tenga células permisivas. El sistema de multiplicación viral más utilizado son los cultivos celulares, que consisten en células provenientes de un órgano de un tejido normal o tumoral, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas.

Estos cultivos se clasifican en 3 tipos: 1) cultivo primario: células obtenidas a partir de tejidos normales y con un crecimiento *in vitro* limitado (5-10 subcultivos); 2) cultivo de células diploides: células diploides obtenidas desde órganos pero que poseen un período de multiplicación *in vitro* mayor que los cultivos primarios (más de 10 subcultivos); 3) líneas celulares: células provenientes de tejidos tumorales o desde cultivos diploides, pero que han sido transformadas, permitiendo su multiplicación indefinida (Murphy *et al.*, 1999).

Para que el aislamiento viral sea exitoso se debe realizar una adecuada toma y envío de muestra con el objetivo de obtener una alta cantidad de virus viables, siendo recomendable muestras tomadas desde secreciones, deposiciones, sangre o líquido cefalorraquídeo. El traslado de la muestra, una vez obtenida, debe ser en un contenedor seguro que permita mantenerlo frío (4°C) (Murphy *et al.*, 1999).

Una vez en el laboratorio, los virus se deben inocular en células permisivas al VDVB y libres de contaminación con el virus. Como el biotipo viral predominante del VDVB es el NCP, debe usarse alguna técnica de identificación viral como la inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa para detectar la presencia del virus (Bezek, 1995).

#### Identificación del VDVB por Inmunofluorescencia Directa

Esta prueba consiste en la detección de los antígenos del VDVB ubicados en el citoplasma de la célula infectada a través de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos contra el virus, unidos a un fluorocromo (conjugado). La presencia del antígeno viral se evidencia por la observación microscópica de las células utilizando un microscopio de fluorescencia el cual emite una luz capaz de excitar al fluorocromo y a la vez detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo. Se describe como una técnica rápida para la identificación de aislados virales (Bezek *et al.*, 1988; Edwards, 1990).

#### Identificación del VDVB por Inmunoperoxidasa Indirecta:

Esta técnica al igual que la IFD permite detectar antígenos virales en células infectadas. El reactivo diagnóstico generalmente consiste en anticuerpos monoclonales contra el virus, los cuales posteriormente son detectados con una inmunoglobulina anti-inmunoglobulina de ratón, conjugada con una peroxidasa. Esta enzima en presencia de un sustrato adecuado forma un producto insoluble de color café que se visualiza en el citoplasma celular con el uso del microscopio óptico. La gran ventaja sobre la IFD es que se necesita para su lectura sólo de un microscopio óptico, evitando así infraestructura de alto costo y un observador muy entrenado. Además, la tinción es estable en el tiempo, lo que facilita evaluaciones posteriores (Castro *et al.*, 1997).

#### Identificación del VDVB por ELISA

Técnica de gran sensibilidad que puede usarse tanto para la detección de antígenos virales como de anticuerpos en animales infectados (Bottcher *et al.*, 1993). El ELISA Indirecto, el más usado para la detección del antígeno viral, utiliza un anticuerpo unido a una fase sólida para capturar al antígeno viral y un segundo anticuerpo unido a una enzima (peroxidasa) que va a generar un producto coloreado en solución. La sensibilidad de detección es similar a la del aislamiento viral (OIE, 2000).

### Identificación del VDVB por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)

Esta prueba permite la detección del virus a través de la amplificación específica de una región altamente conservada del genoma viral (Hamel *et al.* 1995). Se describe como un método rápido, altamente sensible e independiente de la infecciosidad viral, que además permite caracterizar y diferenciar genéticamente distintos aislados virales (Bezek, 1995). Este método además puede ser utilizado para clasificar los aislados de campo y las cepas de laboratorio del VDVB en los genotipos I y II (Ridpath *et al.*, 1994).

## **2.6 CONTROL DEL VDVB**

El VDVB es un virus ampliamente diseminado en el mundo, con prevalencias serológicas que van del 50 al 90% (Baker, 1990) generando importantes pérdidas económicas en la industria del bovino. Por este motivo se hace necesaria una adecuada estrategia de control sobre el VDVB (Bolin, 1990; Goens, 2002).

### Detección y eliminación de individuos persistentemente infectados con el VDVB:

La inmunización de animales susceptibles y la detección y eliminación de animales PI constituyen las medidas básicas en el control y prevención del complejo DVB/EM. (Radostits y Littlejohns, 1988; Gunn, 2002). Esto se debe a que los animales PI son la principal fuente de infección para el ganado susceptible, pues constantemente diseminan virus por sus secreciones y excreciones (Bolin, 1990).

La detección de un animal PI puede realizarse por pruebas de laboratorio que identifiquen al virus en muestras de sangre o secreciones. Para ello, el virus debe ser detectado en un animal, en al menos 2 ensayos sucesivos separados por 3 semanas o más, y presentar ausencia o bajos títulos de anticuerpos neutralizantes.

Para prevenir la aparición de nuevos animales PI, las madres deben ser vacunadas previo al encaste, asegurando un alto título de anticuerpos neutralizantes durante la preñez temprana. Sin embargo, cuando la madre es PI la vacunación no evita el nacimiento de nuevos terneros PI. Cuando existe imposibilidad de vacunación, el ganado reproductor debe ser aislado del resto del rebaño (Bolin, 1990).

Otras medidas útiles son tener en cuenta la cercanía a otros rumiantes e incluso el cerdo, ya que pueden actuar como reservorios, y eventualmente diseminadores del VDVB (Brownlie y Clarke, 1990).

Un punto que siempre se debe tener en cuenta es la posible y no infrecuente contaminación de cultivos celulares y suero fetal bovino comercial con el biotipo NCP de VDVB (Abraham, 1993). Esto conlleva serios problemas en el diagnóstico de laboratorio, como también en el uso de vacunas y suero fetal bovino contaminado (Bolin, 1990; Lindberg y Alenius, 1999).

Tener un predio libre de VDVB es una medida engorrosa, de alto costo y además poco conveniente, pues el nivel de inmunidad en el predio sería bajo o nulo, con los consiguientes resultados desastrosos si llegase a reingresar el virus. Es mucho más recomendable establecer un alto nivel de inmunidad en el predio, e ingresar sólo animales inmunes.

Con los reproductores es necesario llevar un control continuo, manteniendo el nivel de inmunidad a través de vacunaciones o exposiciones controladas antes de la época reproductiva (Duffel y Harkness, 1985).

Otra opción es el "control pasivo" que consiste en la "no intervención" que resulta útil en predios donde hay un alto nivel de inmunidad y las pérdidas son improbables (Harkness, 1987).

Las técnicas diagnósticas se disponen al servicio del control y erradicación tanto en forma individual (cuando el costo/beneficio así lo indique) como así también del rebaño completo. Estas técnicas se usan para determinar el estado sanitario del rebaño, realizar seguimientos de animales infectados y monitoreos constantes para confirmar el estatus de predio libre de VDVB (Houe *et al.*, 2006).

### Control Vacunal

En Europa, las vacunas se emplean sólo en regiones con alta prevalencia de infección con el VDVB. En el resto de las regiones se emplea un riguroso control y erradicación del virus.

El control vacunal del VDVB en un predio requiere elegir el tipo de vacuna más recomendable para el momento en que se realizará la aplicación. Además, siempre se debe tener presente las eventuales diferencias antigénicas entre las cepas vacunales y las cepas actantes en

el campo, ya que pueden ser importantes limitantes en la obtención de resultados óptimos (Radostits y Littlejohns, 1988). Existen 2 tipos de vacunas, aunque ninguna ha demostrado ser completamente eficaz:

- Vacunas de virus muerto: son seguras para hembras preñadas, ya que no causan enfermedades ni inmunodepresión. Sin embargo necesitan de una vacunación de refuerzo para producir inmunidad protectora y además, la duración de la inmunidad no es tan larga como la producida con vacunas a virus vivo modificado (Harkness, 1987).

- Vacunas de virus vivos modificados: producen altos niveles de inmunidad, no siendo necesaria la vacunación de refuerzo. Sin embargo generan cierta inmunodepresión, y lo que es peor puede cruzar la barrera placentaria y producir infección fetal, con consecuencias similares a las producidas por las cepas de campo (Van Oirschot *et al.*, 1999). Sin embargo, las vacunas con virus termosensibles (ts), inducen buena respuesta de anticuerpos séricos y no han sido asociadas a signos clínicos o leucopenia, y además no producen infección fetal debido al crecimiento restrictivo del virus (Baker, 1987).

Por otra parte, el genotipo y subgrupo de los virus utilizados en las vacunas también ha sido tema de controversia, debido a los resultados opuestos obtenidos por distintas investigaciones. Por un lado, un estudio realizado con una vacuna que contenía como cepa vacunal un virus de un genotipo generó protección frente a la infección provocada por ambos genotipos (Brock *et al.*, 2006). Sin embargo, otro estudio realizado con una vacuna que tiene como cepa vacunal a un virus del genotipo contrario al que provoca la infección, arrojó como resultado que la protección generada resulta mucho menos efectiva que si presentara el genotipo que provocó la infección (Ficken *et al.*, 2006). Esto último se ve confirmado en un estudio de este año, en que hembras vacunadas antes del encaste con una cepa vacunal del subgrupo VDVB1a, generan animales PI con virus de los subgrupos VDVB1b y VDVB2a, sugiriendo una protección insuficiente de la cepa vacunal VDVB1a contra la infección con virus de distinto genotipo y subgrupo (Bolin *et al.*, 2009).

## 2.7 SITUACION EN CHILE DEL VDVB

Entre los años 1983 y 1984 se comenzó a sospechar la presencia del VDVB en Chile basado en hallazgos anatomopatológicos (Fiedler *et al.*, 1986). Esto fue confirmado en 1985 cuando se aisló el virus desde un brote de EM en terneros del sur de Chile (Reinhardt *et al.*, 1986).

Estudios serológicos posteriores revelaron una amplia diseminación del virus en Chile, con prevalencias de 69,2% en la IX Región de la Araucanía y X Región de los Lagos (Reinhardt *et al.*, 1990) y de 59,7% en bovinos de leche (Celedón *et al.*, 1996) y de 86% en bovinos de carne (Celedón *et al.*, 1997) en la Región Metropolitana. Además, el virus se ha aislado frecuentemente desde bovinos portadores inmunotolerantes, fetos abortados y animales asintomáticos (Celedón *et al.*, 1998), como así también de ovinos, caprinos, llamas, alpacas, guanacos, e incluso desde un pudú silvestre (Pizarro-Lucero *et al.*, 2005).

Estudios genómicos de aislados virales obtenidos desde bovinos infectados naturalmente han permitido determinar la presencia en Chile de los genotipos VDVB1 y VDVB2 y además establecer la existencia de aislados virales pertenecientes a los subgrupos 1a, 1b y 1c del genotipo VDVB1 (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

Análisis antigénicos de aislados virales de cada genotipo (1 aislado VDVB1b, 1 aislado VDVB1c, 2 aislados VDVB2) por seroneutralización cruzada permitió agrupar a los 4 virus en grupos antigénicos distintos, evidenciando baja o nula antigenicidad cruzada, tanto entre ellos como así también con la cepa vacunal NADL (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

Estudios posteriores sobre las características biológicas de estos 4 virus permitieron establecer que los 4 aislados virales son NCP, presentan la misma eficiencia de síntesis de progenie viral por ciclo infectivo y el mismo tropismo celular, al menos en los cultivos probados, pero presentan marcadas diferencias en la eficiencia y diseminación de la infección, duración del ciclo infectivo viral y número de ciclos virales a 30 horas de infección en cultivos celulares (Montt, 2004).

Esto indica que los virus que circulan en el ganado bovino nacional presentan una alta diversidad genómica, antigénica y biológica, lo que podría traducirse en distintas virulencias de los virus, situación similar a lo que ocurre a nivel mundial con el VDVB.



### **3. OBJETIVOS**

#### **General**

- Determinar la variabilidad genética de aislados chilenos del VDVB por filogenia molecular de la región codificante de la glicoproteína E2 del genoma viral.

#### **Específicos**

1) Aislar cepas chilenas del VDVB desde bovinos de distintas regiones del país y que presentan infecciones subclínicas o cuadros clínicos de distinta gravedad.

2) Obtener la secuencia nucleotídica de la región codificante de la glicoproteína E2 del genoma de los aislados virales chilenos del VDVB.

3) Determinar la variabilidad genética de los aislados chilenos del VDVB por filogenia molecular de la región codificante de la glicoproteína E2.

## **4. MATERIALES Y MÉTODO**

### **4.1 MUESTRAS**

Los virus para el análisis genético se aislaron desde muestras de sangre obtenidas a partir de predios ubicados en la Región Metropolitana de Santiago, VIII Región del Bio Bío y X Región de los Lagos, regiones que concentran la mayor parte de los predios ganaderos de Chile.

Las muestras se tomaron desde animales que presentaban antecedentes que los hacían sospechosos de estar infectados con el VDVB, como por ejemplo aborto, repetición de celo y diarrea; y también de animales asintomáticos como posibles portadores inmunotolerantes del virus.

En el análisis genético también se incluyeron aislados virales obtenidos en el proyecto FONDECYT 1970887, los que se encontraban congelados a -196°C en el laboratorio de Virología de nuestra Facultad.

### **4.2 CULTIVOS DE CÉLULAS MDBK**

Los virus se multiplicaron en monocapas de células epiteliales Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) de bovino, libres de infección por el VDVB. Células MDBK mantenidas en nitrógeno líquido (-196°C) fueron sembradas en botellas de 10 ml con medio de cultivo esencial mínimo (MEM) (Invitrogen) suplementado con suero equino al 5%. Las células se incubaron por 72 horas a 37°C hasta obtener una monocapa completa.

Transcurridas 72 hrs de incubación se eliminó el medio de cultivo, las células se lavaron una vez con 5 ml de solución salina A de Puck y una vez con 1 ml de tripsina-verseno (Tripsina 0,05% Verseno 0,02% en Salina A de Puck) (Puck *et al.*, 1961). Las células se desprendieron de la monocapa celular incubando 10 minutos a 37 °C con 0,5 ml de tripsina-verseno, luego de lo cual se ajustó la concentración de las células a una cantidad de 50 mil células/ml, agregando medio de cultivo MEM con suero equino 5%. Diez ml de la suspensión celular se sembraron en botellas y 2 ml en tubos, luego de lo cual las células se incubaron a 37 °C.

### **4.3 MULTIPLICACIÓN VIRAL**

Para el aislamiento viral desde muestras de sangre y para la reactivación de los aislados virales guardados en el laboratorio de Virología de la Facultad se realizaron pasajes en monocapas de células MDBK.

Para ello, 200 µl de suero o lisados de células infectadas con el virus se inocularon sobre monocapas de células MDBK por 1 hora a 37 °C, luego de lo cual, sobre el inóculo viral se agregó 2 ml de medio MEM con suero equino 5% y se incubó a 37°C por 72 horas (pasaje celular).

Para el segundo pasaje, a las 72 horas de incubación las células con el medio de cultivo se congelaron/descongelaron por tres veces, de tal manera de lisar las células y liberar el virus al medio de cultivo. Luego de lo cual se repitió el procedimiento detallado anteriormente con 200 µl del lisado celular.

Cada virus fue sometido al número de pasajes necesario para obtener un 50-75% de la monocapa celular infectada con el VDVB.

### **4.4 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD) DEL VDVB.**

La presencia del VDVB en las células MDBK se detectó por IFD. Para ello, luego de incubar las células infectadas por 72 horas a 37° C se congelaron / descongelaron 3 veces y se inocularon sobre células crecidas en laminillas de vidrio en tubos Leighton, con posterior incubación por 48 hrs a 37° C.

Las laminillas con células infectadas con VDVB se extrajeron del tubo Leighton, se lavaron con PBS 0,01M pH 7,6 por 5 minutos y se fijaron con acetona fría al 100% durante 10 minutos. Las laminillas fueron conservadas a -20° C.

Posteriormente, las laminillas se hidrataron con PBS 0,01M pH 7,6 por 5 minutos, luego se agregó 30 µl de una dilución 1:50 de anticuerpos policlonales conjugados a isotiocianato de fluorescencia, específico para VDVB (CVL Weibridge), junto con azul de Evans como contratinción y se incubó por 30 minutos a 37° C en cámara húmeda.

Luego, las laminillas se lavaron tres veces por 5 minutos cada vez con PBS 7,6 y una vez con agua destilada y se adicionó 7 µl de glicerina.

La presencia de VDVB se determinó por la detección de fluorescencia específica verde en el citoplasma celular al observar las células con el microscopio de fluorescencia marca Nikon Optiphot-2 con aumento de 200x y 400x. En ausencia del virus, el citoplasma se observó de color rojo.

#### **4.5 AMPLIFICACION POR RT-PCR DE LA REGION E2 DEL GENOMA VIRAL**

##### 4.5.1. Extracción de ARN desde lisados celulares infectados con el VDVB.

Las monocapas de células infectadas fueron congeladas y descongeladas tres veces. A 250 µl del lisado celular se agregó 750 µl de Trizol LS (Invitrogen) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de agregar 400 µl de cloroformo se agitó en vortex por 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 12.000xg por 15 minutos.

Posteriormente, en otro tubo se mezcló 500 µl del sobrenadante obtenido de la centrifugación, con 50 µl de ARN de levadura 1 mg/ml y 550 µl de isopropanol, incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se centrifugó a 12.000 xg durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75%, agitando en vortex por 15 segundos y centrifugando a 7500 xg por 5 minutos. Se repitió el lavado 2 veces más.

Finalmente se dejó secar el ARN por 10 minutos y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril, libre de nucleasa. Luego, el ARN se incubó a 55-60° C por 10 minutos, se agitó en vortex y se guardó a -20° C.

##### 4.5.2 Amplificación por RT-PCR de la región E2 del genoma de VDVB.

La región E2 del genoma viral se amplificó por RT-PCR a partir del ARN total extraído con Trizol LS, usando el kit "SuperScript III One Step / Platinum Taq Polymerase" (INVITROGEN). Los partidores utilizados fueron: E2F (5'-ACTTTGAATTTGGACTYTGCC-3') y E2R (5'-TCCAGGTCAAACCTATTG-3'), sintetizando un fragmento de ADN de 700 pb.

La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl a 50 °C por 30 minutos, bajo las siguientes condiciones: 12,5 µl de la Mezcla de Reacción 2x; 1 µl de la mezcla de enzimas Super Script III / Platinum Taq polimerasa; 1 µl de cada partidore (E2F y E2R, 10

µM cada uno). Luego de la reacción de transcripción inversa, los tubos se incubaron a 94°C por 3 minutos, para inactivar la enzima.

La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto y 68°C por 1 minuto. Finalmente, los tubos se incubaron a 68°C por 5 minutos.

#### 4.5.3 Electroforesis en gel de agarosa

El fragmento de ADN amplificado se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE, con posterior tinción con bromuro de etidio 1 µg/ml.

A 0,5 gramos de agarosa se agregó 25 ml de tampón TBE y se calentó a 100 °C hasta fundir la agarosa. Después de enfriar la solución a 55 °C se vertió en la cubeta de la cámara de electroforesis y se dejó hasta que gelificara.

Se cargó 5 µl de cada reacción de RT-PCR con 1 µl de tampón de muestra para electroforesis (Tris-HCl 10 mM, Azul de Bromofenol 0,03%, Xilen Cianol 0,03%, Glicerol 60%, EDTA 60 mM. FERMENTAS). Como estándar de peso molecular se usó un ADN "ladder" de 100 pb (Invitrogen). El gel se sometió a una electroforesis de 120 V por 35 minutos.

Una vez concluida la electroforesis el gel fue incubado en una solución de bromuro de etidio, 1 µg/ml, por 20 minutos y luego en agua destilada por 5 minutos. Los fragmentos de ADN se observaron en el gel usando un transiluminador con luz UV.

### **4.6 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN E2 DEL GENOMA DE VDVB.**

Los amplicones obtenidos por la amplificación por RT-PCR de la región codificante de la glicoproteína E2 del genoma viral se purificaron y en caso de tener una concentración mayor de 10 ng/µl se secuenciaron directamente ambas cadenas de ADN, usando los partidores E2INF (5'-AACGGACCGGCCTTCCAGATGG-3') y E2INR (5'-TCATATGGTCTGCAAGGCAT-3'). En aquellos casos en que la concentración del amplicón obtenido fue menor de 10 ng/µl, se clonó en el vector plasmidial pGEM T-Easy, el plasmidio incorporó en bacterias *E. coli*, las que luego de ser multiplicadas se les extrajo y purificó el plasmidio y se secuenció el amplicón inserto.

#### 4.6.1 Purificación del amplicón desde la reacción de RT-PCR

Para purificar el amplicón se usó el kit "QIAquick PCR Purification" (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. A un volumen de reacción de PCR se agregó cinco volúmenes de tampón PBI y se cargó en una columna QIAquick inserta en un tubo de 2 ml. Luego de centrifugar a 17.900xg durante 1 minuto y eliminar el líquido del tubo, se agregó 750 µl de tampón PE a la columna y se centrifugó a 17.900xg por 1 minuto nuevamente. Luego de eliminar el líquido del tubo, la columna se centrifugó nuevamente y se colocó en un tubo de 1,5 ml donde se procedió a agregar 50 µl de agua destilada. Luego de incubar a temperatura ambiente por 1 minuto se centrifugó por 1 minuto para eluir el ADN.

#### 4.6.2 Cuantificación del amplicón purificado

El ADN purificado con el kit QIAquick fue cuantificado por electroforesis en gel de agarosa con posterior tinción con bromuro de etidio. La muestra sometida a electroforesis contenía 1 µl del amplicón purificado, 4 µl de agua y 1 µl de tampón de muestra para electroforesis. Como estándar de masa se utilizó ADN del fago ØX174 digerido con HaeIII (Fermentas). Las muestras de ADN a cuantificar junto con el estándar de masa se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 2% en tampón TBE a 100V por 30 minutos. Posteriormente, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio, 1 µg/ml, por 20 minutos y luego en agua destilada por 5 minutos. En un transiluminador con luz UV los amplicones se cuantificaron comparando la intensidad de su fluorescencia, con la fluorescencia de los fragmentos de ADN de masa conocida del estándar presente en el gel.

#### 4.6.3 Clonación del amplicón purificado en el vector pGEM-T Easy

Los amplicones purificados con una concentración menor de 10 ng/µl fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) para aumentar la cantidad del amplicón antes de ser secuenciado.

Para ello, 5-10 ng del amplicón purificado se clonó en 50 ng del vector pGEM-T Easy con 3 unidades de la enzima T4 ADN Ligasa a 4 °C por 16 horas.

Posteriormente, 2 µl de cada reacción de clonación se incubó a 4 °C por 20 minutos con 50 µl de bacterias competentes *E. coli* JM109 recién descongeladas. Luego se aplicó un golpe térmico de 42°C por 50 segundos e inmediatamente se volvió a incubar las células a 4°C por 2 minutos. A continuación se agregó 950 µl de medio SOC (extracto de levadura 5 g/l, triptona 20

g/l, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, glucosa 20 mM,  $Mg^{+2}$  20 mM, pH 7,0) a temperatura ambiente y se incubó a 37°C por 1,5 horas en un agitador orbital termoregulado a 150 rpm. Cumplido el tiempo, 100 µl de cada cultivo transformante se sembró en placas de agar LB/ampicilina/IPTG/X-Gal (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l, ampicilina 100 µg/ml, IPTG 0,5 mM, X-Gal 50 mg/ml, pH 7,0) y se incubó 16-24 horas a 37° C.

Las colonias de color blanco poseen al vector pGEM-T Easy con el inserto de ADN y las colonias azules contienen al vector sin el inserto.

#### 4.6.4 Purificación del plasmidio con el amplicón desde las bacterias transformadas.

Diez colonias blancas fueron seleccionadas desde las placas LB/Ampicilina/ IPTG/X-Gal. Una parte de la colonia se sembró en una placa de agar LB/Ampicilina (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l, ampicilina 100 µg/ml, pH 7,0) y otra parte de la colonia se colocó en tubo con 50 µl de agua destilada estéril. Las bacterias colocadas en agua se incubaron por 5 minutos a 99 °C para lisarlas y liberar el ADN y se centrifugaron a 7.500 x g por 15 minutos.

El lisado bacteriano se utilizó como muestra para realizar un PCR de colonia, de tal manera de detectar la presencia del amplicón en el plasmidio. La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM,  $MgCl_2$  1,6 mM, dNTP 0,2 mM, partidor E2F 0,4 µM, partidor E2R 0,4 µM, Taq Polimerasa Platinum (Invitrogen) 1 U.

La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto. Luego, los tubos se incubaron a 72°C por 10 minutos. El ADN amplificado se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE, con posterior tinción con bromuro de etidio 1 µg/ml.

Aquellas colonias que dieron PCR(+), es decir aquellas que presentaban el plasmidio con el amplicón de 700 pb, fueron sembradas en 10 ml de medio líquido LB/Ampicilina e incubadas por 16 horas a 37 °C en un agitador orbital termoregulado a 200 rpm.

El plasmidio se purificó desde las bacterias transformadas utilizando el kit "GeneJET Plasmid Miniprep" (Fermentas), de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Para ello, 5 ml de medio de cultivo se centrifugó a 6.800 x g por 2 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 250 µl de

solución de resuspensión disgregando las bacterias por pipeteo. Luego se agregó 250 µl de solución de lisis, se mezcló suavemente por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. A continuación se agregó 350 µl de solución de neutralización y se mezcló por inversión varias veces hasta formar un precipitado floculento, el que se precipitó a 14.000 x g por 5 minutos.

El sobrenadante se cargó en una columna del kit inserta en un tubo de 2 ml y luego de centrifugar a 14.000 xg por 1 minuto a temperatura ambiente se eliminó el líquido de la columna. A la columna se agregó 500 µl de solución de lavado y luego de centrifugar a 10.000 xg por 1 minuto se eliminó el líquido. El lavado se repitió 1 vez más.

Posteriormente, la columna vacía se centrifugó a 14.000 xg por 1 minuto y luego de colocar la columna en un tubo de 1,5 ml se agregó 50 µl de agua estéril desionizada, directamente en la matriz de la columna. Luego de incubar por 2 minutos a temperatura ambiente se centrifugó a 14.000 xg por 2 minutos. El plasmidio se guardó a -20°C.

El plasmidio purificado fue cuantificado por electroforesis en gel de agarosa con posterior tinción con bromuro de etidio, de la misma manera como se realizó con el amplicón purificado.

#### **4.7 FILOGENIA MOLECULAR DE LA REGIÓN E2 DEL GENOMA DE VDVB.**

El análisis filogenético molecular de las secuencias nucleotídicas obtenidas se realizó usando el programa MEGA de análisis bioinformático (Kumar et al., 1994). Para ello, las secuencias nucleotídicas obtenidas se alinearon usando el programa Clustal W 1.83, las distancias genéticas existentes entre ellas se calcularon usando el método de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980) y los árboles filogenéticos se construyeron usando el método de "neighbor-joining". La robustez del árbol filogenético obtenido se determinó por un análisis de "bootstrap" de 1000 réplicas.

El análisis por filogenia molecular de las secuencias nucleotídicas obtenidas de la región E2 de los aislados del VDVB permitió clasificar a los virus en genotipos y subgrupos según la nomenclatura definida en la literatura internacional. Para ello, en el análisis se incluyeron secuencias nucleotídicas de genotipos y subgrupos virales del VDVB, disponibles en bancos de datos internacionales (GenBank).



## **5. RESULTADOS**

En esta memoria de título se determinó la variabilidad genética de aislados chilenos del virus diarrea viral bovina por filogenia molecular de la región E2 del genoma viral.

Para ello se tomaron 170 muestras de animales de la Región Metropolitana de Santiago, VIII Región del Bio Bío y X Región de los Lagos, regiones que concentran la mayor parte de los predios ganaderos de Chile. Los predios muestreados presentaron animales con signos clínicos que hacían sospechar de estar infectados con el VDVB, como por ejemplo: aborto, repetición de celo y diarrea. También fueron tomadas muestras de animales asintomáticos o sanos por ser posibles portadores inmunotolerantes del virus.

A 54 muestras de sangre obtenidas de la Región Metropolitana desde un predio con problemas reproductivos, con abortos y animales con síndrome de vaca repetidora, se les realizó la prueba de seroneutralización para determinar el título de anticuerpos seroneutralizantes contra el VDVB. Las 3 muestras de suero (1025, 1061 y 1068) que presentaron títulos de anticuerpos menores a  $<2$ , se les realizaron 3, 10 y 14 pasajes celulares en cultivos de células MDBK respectivamente, hasta obtener una monocapa de células un 50% infectadas con el virus.

En este estudio, también se incluyeron aislados virales obtenidos entre los años 1993-2001 en el marco del proyecto FONDECYT 1970887, los que se encontraban congelados a  $-196^{\circ}\text{C}$  en el laboratorio de Virología de nuestra Facultad. En este caso, los aislados virales se reactivaron por sucesivos pasajes en células MDBK y la posterior identificación del virus se realizó por IFD. Los virus se sometieron a pasajes celulares hasta obtener al menos un 75% de la monocapa celular infectada con el virus.

Del total de muestras analizadas, en 18 de ellas se pudo aislar virus en cantidad suficiente como para secuenciar una zona de la región E2 (Cuadro 1). Es decir, presentaban un mínimo de 75% de la monocapa celular infectada con el VDVB y un RT-PCR positivo para la región E2. En los 18 aislados virales seleccionados se amplificó una zona de la región codificante de la glicoproteína E2 por RT-PCR usando los partidores E2FT/E2RT (Tajima *et al.*, 2001), sintetizándose un fragmento de ADN de 700 pb, visualizado al someter una alícuota de la reacción post-PCR a una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE con posterior tinción con bromuro de etidio. Sin embargo, la cantidad de ADN sintetizado fluctuó entre los distintos aislados virales.

### CUADRO 1: CARACTERÍSTICAS Y ORIGEN DE AISLADOS CHILENOS DEL VDV B

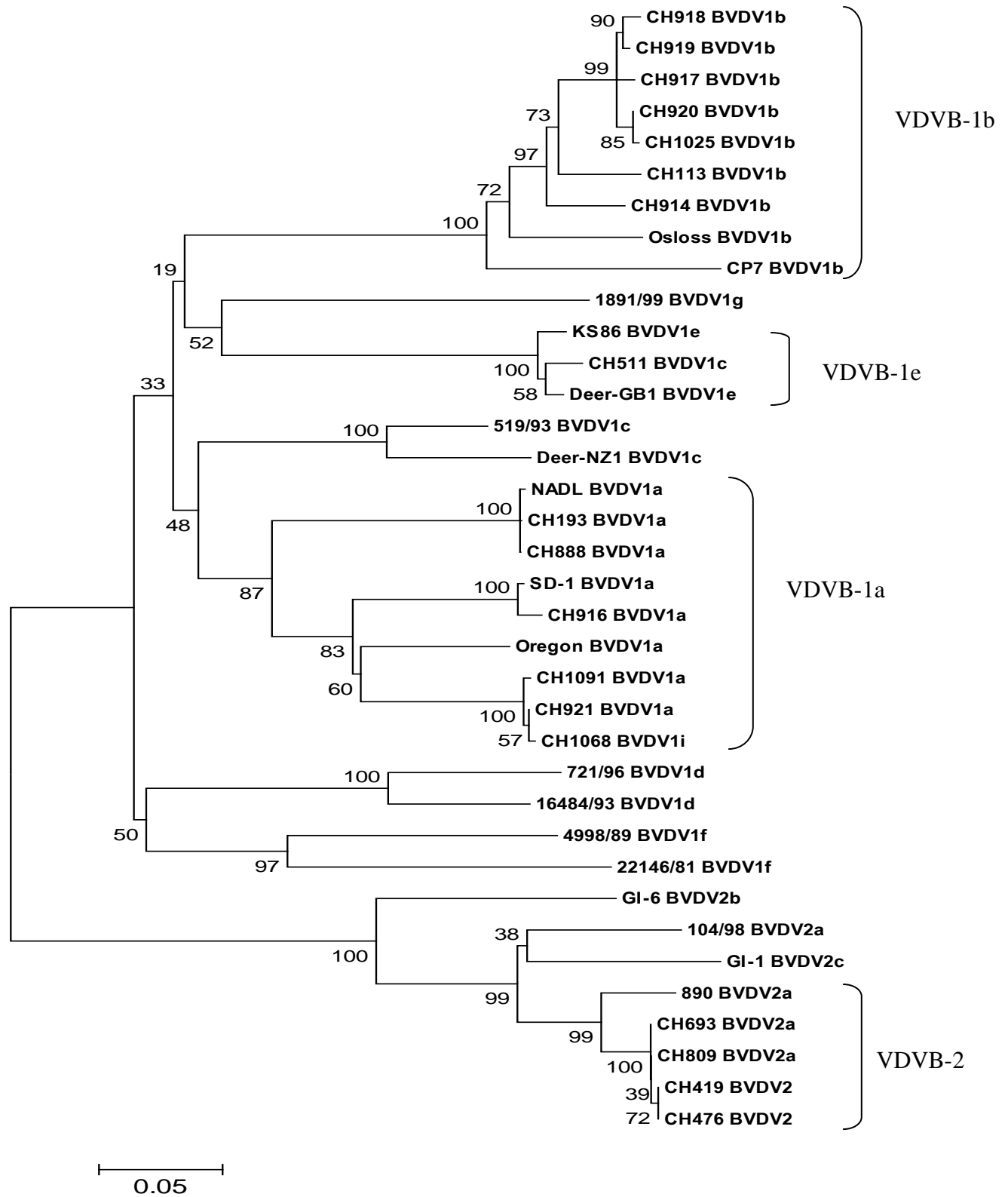
Virus	Año aislamiento	Lugar	Cuadro clínico	Pasajes
113	1995	RM - María Pinto	PIT	11
193	1995	RM – María Pinto	SANO	22
419	1995	RM – Melipilla	SANO	3
476	1995	RM	SANO	3
511	1993	VI – Rancagua	ABORTO	3
693	1996	RM – Talagante	SANO	5
809	1998	RM - María Pinto	DIARREA	3
888	2001	RM – Melipilla	MUERTE PERINATAL	5
914	2005	X – Pitrufoquén	ABORTO	7
916	2003	X – Valdivia	PIT	4
917	2003	X – Llanquihue	PIT	4
918	2003	X – Llanquihue	PIT	4
919	2003	X – Llanquihue	PIT	4
920	2003	X – Llanquihue	PIT	7
921	2003	X - Los Muermos	PIT	7
1025	2007	RM – Melipilla	PR	3
1068	2007	RM – Melipilla	PR	14
1091	2007	VIII – Chillán	SANO	7

RM: Región Metropolitana; VI: Región del Libertador Bernardo O'Higgins; VIII: Región del Bio Bio; X: Región de los Lagos; PIT: Portador Inmuno Tolerante.

De los 18 aislados virales, 17 fueron secuenciados directamente y sólo la cepa 113 fue clonada en el vector pGEM-T Easy. Los fragmentos de ADN fueron secuenciados con éxito en el Centro de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y en la empresa Genytec, usando los partidores internos E2INF y E2INR (Tajima *et al.* 2001).

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se alinearon junto con 18 secuencias nucleotídicas pertenecientes a los subgrupos 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 2a, 2b y 2c del VDV B, disponibles en bancos de datos internacionales, usando el programa Clustal W 1.83.

El análisis filogenético molecular se realizó en una región de 420 nucleótidos entre las posiciones 2879-3298 del genoma de la cepa NADL del VDV B. El árbol filogenético obtenido se presenta en la Figura 1.



**FIGURA 1: ARBOL FILOGENETICO DE UNA ZONA DEL GEN DE LA PROTEÍNA E2 DE AISLADOS CHILENOS DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA**

El análisis filogenético indica que del total de aislados virales analizados, 14 pertenecen al genotipo VDVB-1 y 4 al genotipo VDVB-2 (Cuadro 2). De los virus pertenecientes al genotipo VDVB-1, 6 pertenecen al subgrupo VDVB1a, 7 al subgrupo VDVB1b y 1 al subgrupo VDVB1e. Los 4 virus del genotipo VDVB-2 pertenecen al subgrupo VDVB2a.

**CUADRO 2: GENOTIPOS Y SUBGRUPOS DE AISLADOS CHILENOS DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA OBTENIDOS POR FILOGENIA MOLECULAR DE UNA REGIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA E2**

<b>Virus</b>	<b>Año aislado</b>	<b>Lugar</b>	<b>Cuadro clínico</b>	<b>Genotipo</b>
113	1995	RM - María Pinto	PIT	1b
193	1995	RM- María Pinto	SANO	1a
419	1995	RM – Melipilla	SANO	2a
476	1995	RM	SANO	2a
511	1993	VI – Rancagua	ABORTO	1e
693	1996	RM – Talagante	SANO	2a
809	1998	RM - María Pinto	DIARREA	2a
888	2001	RM - Melipilla	MUERTE PERINATAL	1a
914	2005	X – Pitrufquén	ABORTO	1b
916	2003	X – Valdivia	PIT	1a
917	2003	X – Llanquihue	PIT	1b
918	2003	X – Llanquihue	PIT	1b
919	2003	X – Llanquihue	PIT	1b
920	2003	X – Llanquihue	PIT	1b
921	2003	X - Los Muermos	PIT	1a
1025	2007	RM – Melipilla	PR	1b
1068	2007	RM – Melipilla	PR	1a
1091	2007	VIII - Chillán	SANO	1a

RM: Región Metropolitana; VI: Región del Libertador Bernardo O'Higgins; VIII: Región del Bio Bio; X: Región de los Lagos; PIT: Portador Inmune Tolerante.

Los virus del genotipo VDVB2a además de ser pocos, todos corresponden a virus obtenidos en la Región Metropolitana entre 1995 y 1998, en el marco del proyecto FONDECYT 1970887, no encontrándose virus de este genotipo en las muestras aisladas posteriores a esa fecha. En contraste, los virus del genotipo VDVB1 se distribuyeron tanto en la zona central como en la zona sur del país y fueron aislados desde el año 1995 al año 2007.

Los porcentajes de identidad nucleotídica (PIN) entre los virus de los genotipos VDVB-1 y VDVB-2 van entre 62 a 65% (Cuadro 3). Los PIN entre los aislados virales pertenecientes al genotipo VDVB-1 van entre 71 a 100 % y entre los aislados virales pertenecientes al genotipo VDVB-2 de un 99 a un 100%. Esto indica una alta semejanza genética entre los virus del genotipo VDVB-2 y una gran diversidad genética entre los virus del genotipo VDVB-1 y VDVB-2.

En los subgrupos del genotipo VDVB-1 el PIN intrasubgrupo VDVB1a va entre un 83-100 % y entre 92-99% dentro del subgrupo VDVB-1b. Los PIN intersubgrupo fueron de un 72-75% entre los subgrupos VDVB-1a y VDVB-1b, de un 75-78 % entre los subgrupos VDVB-1a y VDVB-1e y de un 71-72 % entre los subgrupos VDVB-1b y VDVB-1e.

**CUADRO 3: PORCENTAJES DE IDENTIDAD NUCLEOTIDICA (PIN) DE UNA REGIÓN DEL GEN E2 ENTRE VIRUS CHILENOS DE LOS GENOTIPOS VDVB-1 Y VDVB-2.**

## G E N O T I P O 2

G E N O T I P O  1	Aislados Virales	419	476	693	809
	113	64	64	64	64
193	65	65	65	65	
511	63	63	63	63	
888	65	65	65	65	
914	64	64	65	65	
916	64	64	64	64	
917	63	63	63	63	
918	63	63	63	63	
919	64	64	64	64	
920	63	63	63	63	
921	64	64	64	64	
1025	62	62	63	63	
1068	64	64	64	64	
1091	64	64	64	64	

## **6. DISCUSIÓN**

Los resultados indican la presencia en Chile de los genotipos VDVB1 y VDVB2, aunque la gran mayoría de los virus aislados pertenecen al genotipo VDVB-1 (77,8%) y solo una pequeña proporción de ellos pertenece al genotipo VDVB-2 (22,2%).

Al comparar estos resultados con estudios previos realizados en el país (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006), se observa una gran diferencia en la composición genética de los virus. Así, en el estudio publicado en el año 2006, con virus aislados entre los años 1993-2001 desde bovinos nacionales infectados naturalmente, más de la mitad de los aislados virales fueron clasificados como del genotipo VDVB-2 (51,5%). Sin embargo, los resultados de este estudio indican que sólo un 22,2 % de los virus corresponden al genotipo VDVB-2.

Además, en este trabajo se observa que los 4 virus pertenecientes al genotipo VDVB-2 fueron aislados entre los años 1995-1998, tanto de individuos sanos como de animales con cuadros digestivos, manteniéndose guardados en el laboratorio de Virología desde esa fecha hasta el desarrollo de este estudio. Es decir, ninguna de las muestras obtenidas en los últimos 8 años permitieron aislar virus del genotipo VDVB-2, lo que sugiere la ausencia o por lo menos la disminución de este genotipo viral en el ganado bovino nacional en la actualidad.

Por otro lado, los valores de PIN obtenidos muestran que los virus pertenecientes al genotipo VDVB-1 son genéticamente más heterogéneos que los virus pertenecientes al genotipo VDVB-2 (PIN intragenotipos de 71-100% y 99-100%, respectivamente). Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura internacional, e indica que en Chile, los virus pertenecientes al genotipo VDVB-1 también se encuentran circulando por mayor tiempo que los virus del genotipo VDVB-2 en el ganado bovino nacional (Becher *et al.*, 1999; Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Vilcek *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos indican que los subgrupos predominantes del VDVB-1, son el subgrupo 1b (7 aislados), el subgrupo 1a (6 aislados) y en menor proporción el subgrupo 1e (1 aislado). Según estudios anteriores (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006), de 9 virus analizados del genotipo VDVB-1, 6 eran del subgrupo 1b, 2 del subgrupo 1e (1c según la nomenclatura de la época) y 1 del subgrupo 1a. Por lo tanto, en este estudio se confirma la posible alta prevalencia del subgrupo VDVB 1b en el ganado bovino nacional y el alza en el aislamiento de virus del subgrupo VDVB 1a.

Sin embargo, en un estudio paralelo realizado en nuestro laboratorio, que estudió la variabilidad genética de aislados nacionales del VDVB por filogenia molecular de la región 5' NCR del genoma viral, permitió determinar que la mayoría de los virus analizados (44,4%) pertenecían al subgrupo 1j (1e, según la región E2). Esto indica que si bien este tipo de estudios nos permite conocer los principales genotipos y subgrupos de los virus que se encuentran circulando en el ganado bovino nacional, no entrega información fidedigna acerca de la prevalencia verdadera de los distintos tipos virales en los bovinos.

Al comparar la diversidad genética de nuestros aislados virales con la realidad internacional, en Norteamérica vemos una alta prevalencia de cepas del genotipo VDVB-2, cercana al 40% de los virus aislados. Con respecto a los virus pertenecientes al genotipo VDVB-1, los virus pertenecen mayoritariamente a los subgrupos 1a y 1b, siendo este último el que agrupa a la mayoría de los virus actualmente aislados (Tajima y Dubovi, 2005).

En Europa, el genotipo VDVB-1 es el genotipo prevalente, no encontrándose el genotipo VDVB-2 o bien, con bajas prevalencias (Vilcek *et al.*, 1999; Vilcek *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2005; Wolfmeyer *et al.*, 1997). Sin embargo, se observa una gran diversidad de subgrupos entre los distintos países del continente europeo. Así, diversos estudios de tipificación genética basados en la región 5'UTR y Npro, han permitido conocer que: en Italia los subgrupos prevalentes son 1a, 1b, 1d, 1e, 1f, 1g y 1h predominando el 1b y 1e (Giammarioli *et al.*, 2008); en Austria los subgrupos detectados son 1a, 1b, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1k y el VDVB -2, predominando el 1h y 1f (Hornberg *et al.*, 2008); en España, los subgrupos reportados son el 1b, 1c y 1h predominando el 1b (Arias *et al.*, 2003); en Alemania los subgrupos reportados son el 1a, 1b, 1c, 1f, 1g predominando el 1b (Tajima *et al.*, 2001); en el Reino Unido los subgrupos presentes son el 1a, 1b y 1i predominando 1a (Vilcek *et al.*, 1999); y en Dinamarca los subgrupos presentes son el 1b, 1d y 1e predominando el 1b (Uttenthal *et al.*, 2005).

Al analizar la variabilidad genética de los virus descritos en Sudamérica, podemos observar que en Argentina se reportan virus pertenecientes a ambos genotipos, pero la gran mayoría corresponden a virus del genotipo VDVB-1 (Jones *et al.*, 2001). Dentro del genotipo 1, los subgrupos presentes son 1a, 1b, 1i y 1j, pero con predominancia de los virus del subgrupo 1a, en segundo lugar el subgrupo 1b, con sólo 2 aislados del subgrupo 1j, siendo el genotipo VDVB-2 considerado emergente (Jones *et al.*, 2001).

La situación de Brasil es similar a la reportada en Argentina, con virus pertenecientes a ambos genotipos, pero con predominancia del genotipo VDVB-1, dentro del cual prevalecen en número, al igual que en Argentina, los subgrupos 1a y 1b (Canal *et al.*, 1998; Cortez *et al.*, 2006). Sin embargo, se reporta la presencia de virus de los subgrupos VDVB-1i y 1d y no se ha informado de aislamientos de virus del subgrupo 1j (Cortez *et al.*, 2006).

Para la industria bovina es de vital importancia controlar este virus debido a la gran diversidad de cuadros clínicos que genera, afectando distintas etapas productivas y provocando grandes pérdidas económicas (Houe, 2003). Debido a esto las industrias ganaderas han adoptado una serie de medidas, orientadas al control y la prevención, con el objetivo de minimizar las pérdidas económicas producidas por el VDVB.

Hoy en día la prevención de esta infección está focalizada principalmente en evitar las infecciones fetales, mediante la generación de inmunidad en las hembras, previo a la preñez, a través del uso de vacunas acompañada de la eliminación de posibles fuentes de infección en los fetos (animales portadores inmunotolerantes) (Sandvik, 2004).

En Chile, actualmente se permite el uso de vacunas inactivadas del VDVB, las que en algunos lugares de la zona sur del país se utilizan masivamente (Reinhardt, 1992). Uno de los problemas que presentan estas vacunas inactivadas, es la imposibilidad de entregar una protección absoluta, permitiendo la diseminación del VDVB (Sandvik, 2004). Si bien el uso de vacunas vivas modificadas, que brindan una protección mas completa, podrían ser una alternativa para una adecuada estrategia vacunal, es fundamental el uso de cepas vacunales que confieran una protección adecuada contra las variantes antigénicas prevalentes en la región a aplicar.

Si bien este estudio no permite determinar la verdadera prevalencia de los genotipos y subgrupos del VDVB en el ganado nacional, los antecedentes obtenidos nos indican claramente que para tener un programa efectivo de control y prevención del VDVB en el país, es clave el uso de cepas vacunales con los genotipos y subgrupos del VDVB presentes en Chile, en orden a generar una inmunidad protectora eficiente, que minimice las pérdidas económicas producidas por el VDVB.

Esto es más válido aún cuando la antigenicidad cruzada entre virus de ambos genotipos y de algunos subgrupos es baja. Estudios nacionales e internacionales evidencian la bajísima antigenicidad cruzada entre virus del genotipo 2 y del subgrupo 1j (según 5'NCR) -1e (según E2)- con virus del subgrupo 1a y 1b, virus utilizados mayoritariamente en las vacunas comercialmente disponibles (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006; Nagai *et al.*, 2008).



Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta memoria sugieren fuertemente que la inmunidad protectora entregada por estas vacunas frente a algunos virus que circulan en el territorio nacional sería muy baja, y por lo tanto la conveniencia de explorar la formulación y uso de vacunas con cepas nacionales del virus que entreguen una mejor protección al ganado bovino frente al VDVB.

## **CONCLUSIONES**

- De los 18 virus aislados desde animales asintomáticos y con distintos cuadros clínicos, 14 virus pertenecen al genotipo VDVB-1 y 4 al genotipo VDVB-2.
- De los 14 virus pertenecientes al genotipo VDVB-1, 6 pertenecen al subgrupo 1a, 7 al subgrupo 1b, y 1 al subgrupo 1e.
- En las muestras obtenidas entre los años 2003-2007 no se aislaron virus del genotipo VDVB-2, lo que podría deberse a una baja presencia del virus en las regiones analizadas del país.
- La composición genética de los aislados virales chilenos analizados en esta memoria, indica que ésta es muy similar a la reportada en los aislados del VDVB presentes en Argentina.

## BIBLIOGRAFÍA

**ABRAHAM, A.** 1993. Bovine viral diarrhoea virus contamination of commercial bovine foetal serum. *Isr. Vet. J.* 48:120-122.

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

**ARIAS, P.; ORLICH, M.; PRIETO, M.; CEDILLO, S.; THIEL, H-J.; ALVAREZ, M.; BECHER, P.** 2003. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. *Vet. Microbiol.* 96:327-336.

**BAKER, J. C.** 1987. Bovine viral diarrhoea virus. A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190:1449-58.

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

**BAULE, C.; KULCSÁR, G.; BELÁK, K.; ALBERT, M.; MITTELHOLZER, C.; SOÓS, T.; KUCSERA, L.; BELÁK, S.** 2001. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type. I. *J. Clin. Microbiol.* 39:146-53.

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

**BECHER, P.; ORLICH, M.; KOSMIDOU, A.A; KONIG, M.; BAROTH, M.; THIEL, H-J.** 1999. 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 bovine viral diarrhoea virus result in altered growth characteristics. *J. Virol.* 74:7884-94.

**BENDFELDT, S.; RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D.** 2007. Activation of cell signaling pathways is dependant on the biotype of bovine viral diarrhoea viruses type 2. *Virus. Res.* 126:96-105.

**BEZEK, D.M.; BAKER, J.C.; KANEENE, J.B.** 1988. Immunofluorescence of bovine virus diarrhoea antigen in white blood cells from experimentally infected immunocompetent calves. *Can. J. Vet. Res.* 52: 288-290.

**BEZEK, D. M.** 1995. Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection: Individual and herd diagnosis. *Comp. Cont. Educ. Prac. Vet.* 17: 57-63.

**BOLIN, S.R.** 1990. Control of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz.* 9:163-171.

**BOLIN, S.R.; 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.** 1995. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 11:615-25.

**BOLIN, S.R.; LIM, A. ; GROTELUESCHEN, D.M. ; McBETH, W.W. ; CORTESE, V.S.** 2009. Genetic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from persistently infected calves born to dams vaccinated against bovine viral diarrhoea virus before breeding. *Am. J. Vet. Res.* 70 : 86-91.

**BOULANGER, D.; MIGNON, B. ; WAXWEILER, S.; PASTORET, P-P.** 1992. Données récentes sur la biologie moléculaire du pestivirus responsables de la Maladie des Muqueuses (BVD/MD). *Ann. Med. Vet.*136:33-38.

**BÖTTCHER, J.; GOTTSCHALK, E.; GREISER-WILKE, I.; MOENNIG, V.; BOMMELI, W.; LIESS, B.** 1993. Diagnosis of bovine virus diarrhoea by two enzyme-linked immunosorbent assays. *Rev. Sci. Tech.* 12:461-9.

**BRACKENBURY, L.S.; CARR, B.V.; CHARLESTON, B.** 2003. Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Vet. Microbiol.* 96:337-344.

**BROCK, K.V.; MCCARTY, K.; CHASE, C.C.; HARLAND, R.** 2006. Protection against fetal infection with either bovine viral diarrhoea virus type 1 or type 2 using a noncytopathic type 1 modified-live virus vaccine. *Vet. Ther.* 7:27-34.

**BROWNLIE, J.; CLARKE, M.; HOWARD, C.** 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 114: 535-536.

**BROWNLIE J.** 1990. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus infection. *Rev. sci. tech. off. int. Epiz* 9:43-59.

**BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.** 1990. Bovine virus diarrhoea virus: speculation and observations on current concepts. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 7:223-230.

**CASTRO, M.D.; STOFFREGEN, W.C.; BRIGMAN, G.P.; HILLARD, K.A.** 1997. A method to detect bovine viral diarrhoea virus contamination in cell cultures using immunoperoxidase staining. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:427-31.

**CANAL, C.W.; STRASSER, M.; HERTIG, C.; MASUDA, A.; PETERHANS, E.** 1998. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet. Microbiol.* 63:85-97.

**CELEDÓN, M.; VARGAS, C.; SALINAS, A.; CASANOVA, A.; IBARRA, L.; BERRÍOS, 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.; PALACIOS, L.; PIZARRO, J.; IBARRA, L.** 1997. Prevalencias de anticuerpos seroneutralizantes para el virus de la diarrea viral bovina en ganado de carne de la Región Metropolitana de Chile. *Av. Cs. Vet.* 12: 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.

**CONFER, A.W.; FULTON, R.W.; STEP, D.L.; JOHNSON, B.J.; RIDPATH, J.F.** 2005. Viral antigen distribution in the respiratory tract of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus subtype 2a. *Vet. Pathol.* 42:192-9.

**CORAPI, W.V.; ELLIOTT, R.D.; FRENCH, T.W.; ARTHUR, D.G.; BEZEK, D.M.; DUBOVI, E.J.** 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:590-6.

**CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.; MARNIE, A.; SOARES, R.; PINTO, A.; ALFIERI, A.; FLORES, E.; CERQUEIRA, R.; REICHTZENHAIN, L.** 2006. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5' – UTR region. *Pesq. Vet. Bras.* 26:211-216.

**COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; COLLARD, A.; QUENON, P.; DEHAN, P.; HAMERS, C.; PASTORET, P.-P.; KERKHOFS, P.** 2002. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus. Res.* 84:17 – 28.

**CHARLESTON, B.; FRAY, M.D.; BAIGENT, S.; CARR, B.V.; MORRISON, W.I.** 2001. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J. Gen. Virol.* 82(Pt8): 1893-1897.

**DUFFELL, S.J.; HARKNESS, J. W.** 1985. Bovine Virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.* 117:240-5.

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

**EVERMANN, J.F.; RIDPATH, J.F.** 2002. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the Northwestern United States. *Vet. Microbiol.* 89:129-39.

**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.

**FICKEN, M.D.; ELLSWORTH, M.A.; TUCKER, C.M.; CORTESE, V.S.** 2006. Effects of modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines containing either type 1 or types 1 and 2 BVDV on heifers

and their offspring after challenge with noncytopathic type 2 BVDV during gestation. J. Am. Vet. Med. Assoc. 228:1559-64.

**FRAY, M.D.; MANN, G.E.; CLARKE, M.C.; CHARLESTON, B.** 2000a. Bovine viral diarrhoea virus its effects on ovarion function in the cow. Vet. Microbiol. 77:185-194.

**FRAY, M.D.; PATON, D.J.; ALENIUS, S.** 2000b. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. Anim. Reprod. Sci. 60-61:615-27.

**FULTON, R.W.; RIDPATH, J.F.; SALIKI, J.T.; BRIGGS, R.E.; CONFER, A.W.; BURGE, L.J.; PURDY, C.W.; LOAN, R.W.; DUFF, G.C.; PAYTON, M.E.** 2002. Bovine viral diarrrhea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. Can.J. Vet. Res. 66:181-190.

**GALLETI – VERNAZZANI, E.I.** 1997. Relación del virus diarrea viral bovina con el aborto y/o síndrome de vaca repetidora en bovinos serológicamente negativos a brucelosis. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 53 Páginas.

**GARD, J.A.; GIVENS. M.D.; STRINGFELLOW, D.A.** 2007. Bovine viral diarrrhea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. Theriogenology. 68:434-42.

**GIAMMARIOLI, M.; PELLEGRINI, C.; CASCIARI, C.; ROSSI, E.; DE MIA, G.M.** 2008. Genetic diversity of bovine viral diarrrhea virus 1: Italian isolates clustered in at least seven subgenotypes. J. Vet. Diagn. Invest. 20:783-8.

**GIL, L.; ANSARI, I.; VASSILEV, V.; LIANG, D.; LAI, V.; ZHONG, W.; HONG, Z.; DUVONI, E.; DONIS, R.** 2006. The amino – terminal domain of bovine viral diarrrhea virus Npro protein in neccesary for alpha /beta interferon antagonism. J. Virol. 80 :900-911.

**GLEW, E.J.; CARR, B.V.; BRACKENBURY, L.S.; HOPE, J.C.; CHARLESTON, B.; HOWARD, C.J.** 2003. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. J. Gen. Virol. 84:1771-1780.

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

**GRASSMANN, C.W.; ISKEN, O.; TAUTZ, N.; BEHRENS, S.E.** 2001. Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J. Virol.* 75:7791-802.

**GUNN, G.** 2002. Bovine virus diarrhoea virus wick way to turn?. *Vet J.* 163:226-227.

**HAMEL, A.L.; WASYLYSHEN, M.D.; NAYAR, G.P.S.** 1995. Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus using RNA extracted directly from assorted specimens and a one tube reverse transcription PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 33:287-291.

**HARADA, T.; TAUTZ, N.; THIEL, H-J.** 2000. E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. [J. Virol.](#) 74:9498-506.

**HARKNESS J.W.** 1987. The control of bovine viral diarrhoea virus infection. *Ann. Rech. Vet.* 18:167-174.

**HEUER, C.; HEALY, A.; ZERBINI, C.** 2007. Economic effects of exposure to bovine viral diarrhoea virus on dairy herds in New Zealand. *J. Dairy Sci.* 90:5428-38.

**HILTON, L.; MOGANERADJ, K.; ZHANG, G.; CHEN, Y.H.; RANDALL, R.E.; MCCAULEY, J.W.; GOODBOURN, S.** 2006. The Npro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *J. Virol.* 80:11723-32.

**HORNBERG, A.; FERNÁNDEZ, S.R.; VOGL, C.; VILCEK, S.; MATT, M.; FINK, M.; KÖFER, J.; SCHÖPF, K.** 2008. Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet. Microbiol.* 135:205-13.

**HORZINEK M.C.** 1990. Bovine virus diarrhoea virus: an introduction. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 9:13-23.

**HOUE H.** 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64: 89 – 107.



**HOUE, H.** 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*. 31:137-43.

**HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V.** 2006. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:427-36.

**HOWARD C.J.** 1990. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev.Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9: 95 – 103.

**IQBAL, M.; POOLE, E.; GOODBOURN, S.; MCCAULEY, J.W.** 2004. Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J. Virol.* 78:136-145.

**ISKEN, O.; GRASSMANN, C.W.; YU, H.; BEHRENS, S.E.** 2004. Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhoea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA*. 10:1637-52.

**JACKOVA, A.; NOVACKOVA, M.; PELLETIER, C.; AUDEVAL, C.; GUENEAU, E.; HAFFAR, A.; PETIT, E.; REHBY, L.; VILCEK, S.** 2008. The extended genetic diversity of BVDV-1: Typing of BVDV isolates from France. *Vet. Res. Commun.* 32:7-11.

**JONES, L.; ZANDOMENI, R.; WEBER, L.** 2001. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Vet. Microbiol.* 81:367-375.

**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.*:1379-1384.

**KIMURA, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.

**KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. 1994.** MEGA: molecular evolutionary genetic analysis software for microcomputers. *Comp. Appl. Biosci.* 10:189-191.

**LACKNER, T.; MÜLLER, A.; PANKRAZ A.; BECHER, P.; THIEL, H-J.; GORBALENYA, A.E.; TAUTZ, N.** 2004. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J. Virol.* 78:10765-10775.

**LAMBOT, M.; JORIS, E.; DOUART, A.; LYAKU, J.; LETESSON, J.J.; PASTORET, P.P.** 1998. Evidence for biotype-specific effects of bovine viral diarrhoea virus on biological responses in acutely infected calves. *J. Gen. Virol.* 79:7-30.

**LINDBERG, A.; ALENIUS, S.** 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.* 64:197-222.

**LIANG, D.; SAINZ I.; ANSARI, I.; GIL, L.; VASSILEV, V.; DONIS, R.** 2003. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J. Gen. Virol.* 84:1269-1274.

**LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D.** 2002. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral diarrhoea virus type II in calves. *Am. J. Vet. Res.* 3:1575-1584.

**LINDENBACH, B. D.; RICE C. M.** 2001. *Flaviviridae: the viruses and their replication.* 991-1042.

**LUZZAGO, C.; BANDI, C.; BRONZO, V.; RUFO, G.; ZECCONI A.** 2001. Distribution pattern of bovine viral diarrhoea virus strains in intensive cattle herds in Italy. *Vet Microbiol.* 83: 265-274.

**MANDL, C.W.; HOLZMANN, H.; MEIXNER, T.; RAUSCHER, S.; STADLER, P.F.; ALLISON, S.L.; HEINZ, F.X.** 1998. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *J. Virol.* 72:2132-40.

**MAKOSCHEY, B.; GELDER, P.T.J.A.; KEIJSERS, V.; GOOVAERSTS, D.** 2003. Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. *Biologicals.* 31: 203 – 208.

**MAKOSCHEY, B.; BECHER, P.; JANSSEN, M.G.; ORLICH, M.; THIEL, H-J.; LÜTTICKEN, D.** 2004. Bovine viral diarrhoea virus with deletions in the 5'-nontranslated region: reduction of replication in calves and induction of protective immunity. *Vaccine.* 22:3285-3294.

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

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

**MONTT, J.** 2004. Caracterización biológica de aislados nacionales del virus diarrea viral bovino 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.

**MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D.** 1995. *Virus Taxonomy. Sixth report.* Springer-Verlag Wien. Austria. 586 p.

**MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORNIZEK, M.C.; STUDDERT, M.J.** 1999. *Veterinary Virology. Third Edition.* Academic Press. USA. 629 p.

**NAGAI, M.; HAYASHI, M.; ITOU, M.; FUKUTOMI, T.; AKASHI, H.; KIDA, H.; SAKODA, Y.** 2008. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes.* 36:135-139.

**NETTLETON, P.F.; ENTRICAN, G.** 1995. Ruminant pestiviruses. *Br. Vet. J.* 151:615-42.

**OIE.** 2000. Organización Mundial de Sanidad Animal. Office International des epizooties. Suplemento al: Manual of Standards for Diagnosis Test and Vaccines for List A and B Disease of Mammals, Birds and Bees. 4ta edición.

**PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TUSSEN, P.** 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology.* 203:60-68.

**PERDRIZET J.; REBHUN W.; DUBONI E.; DONIS R.** 1987. Bovine virus diarrhea – clinical syndromes in dairy herds. *Cornell Vet.* 77:46-74.

**PIZARRO – LUCERO, J.; CELEDÓN, M.O.; NAVARRO, C. ORTEGA, R; GONZALEZ, D.** 2005. Identification of a pestivirus isolated from a free – ranging pudu (pudu puda) in Chile. *Vet. Rec.* 157:292-294.

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

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

**RADOSTITS, O.M.; LITTLEJHONS, I.R.** 1988. News concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. *Can. Vet. J.* 29:513-528.

**REDDY, J.R.; XUE, W.; RIVERA, S.; MINOCHA, H.C.** 1995. Antigenic differences between a field isolate vaccine strains of bovine viral diarrhoea virus. *J. Clin. Microbiol.* 33:2159-2161.

**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 diarrhoea/mucosal disease in Southern Chile. *Prev. Vet. Med.* 10:73-78.

**REINHARDT, G.** 1992. Diarrea viral bovina/enfermedad mucosa una enfermedad viral compleja. *Monografías. Med. Vet.* 14: 49 – 55.

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

**RIDPATH, J.F.** 2005. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev. Vet. Med.* 72:17-30.

**RIDPATH, J.F.; BENDFELDT, S.; NEILL, J.D.; LIEBLER-TENORIO, E.** 2006. Lymphocytopathogenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV. *Virus Res.* 118:62-9.

**RISATTI, G.R.; BORCA, M.V.; KUTISH, G.F.; LU, Z.; HOLINKA, L.G.; FRENCH, R.A.; TULMAN, E.R.; ROCK, D.L.** 2005. The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine. *J Virol.* 79:3787-96.

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

**RUGGLI, N.; TRATSCHIN, J.D.; SCHWEIZER, M.; MCCULLOUGH, K.C.; HOFMANN, M.A.; SUMMERFIELD, A.** 2003. Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of N(pro). *J. Virol.* 77:7645-54.

**SAKODA, Y.; OZAWA, S.; DAMRONGWATANAPOKIN, S.; SATO, M.; ISHIKAWA, K.; FUKUSHO, A.** 1999. Genetic heterogeneity of porcine and ruminant pestiviruses mainly isolated in Japan. *Vet. Microbiol.* 65:75-86.

**SANDVIK, T.** 2004. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 20:151-69.

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

**SMIRNOVA, N.P.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; VAN CAMPEN, H.; AUSTIN, K.J.; HAN H.; MONTGOMERY, D.L.; SHOEMAKER, M.L.; VAN OLPHEN, A.L.; HANSEN, T.R.** 2008. Acute non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. *Virus Res.* 132(1-2):49-58.

**TAJIMA, M; FREY, H.R; YAMATO, O; MAEDE, Y; MOENNING, V; SCHOLZ, H; GREISER-WILKE, I.** 2001. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Research.* 76:31-42.

**TAJIMA, M.** 2004. Bovine viral diarrhoea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. *Vet. Microbiol.* 99:131-138.

**TAJIMA, M.; DUBOVI, E.** 2005. Genetic and clinical analyses of bovine viral diarrhoea virus isolates from dairy operations in the United States of America. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17:10-15.

**TAUTZ, N.; KAISER, A.; THIEL, H-J.** 2000. NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology.* 1;273:351-63.

**THIEL, H-J.; STARK, R.; WEILAND, E.; RÜMENAPF, T.; MEYERS., G.** 1991. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* 65:4705-4712.

**TOPLIFF, C.L.; CHON, S.K.; DONIS R.O.; ESKRIDGE, K.M.; KELLING, C.L.** 2005. In vitro and in vivo translational efficiencies of the 5' untranslated region from eight genotype 2 bovine viral diarrhoea virus field isolates. *Virology.* 20;331:349-356.

**UTTENTHAL, A.; STADEJEK, T.; NYLIN, B.** 2005. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) in Denmark during a 10-year eradication period. *APMIS.* 113:536-41.

**VAN OIRSCHOT, J.T.; BRUSCHKE, C.J.M.; VAN RIJAN, P.A.** 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 64:169-183.

**VILCEK, S.; DREW, T.W.; MCGOLDRICK, A.; PATON, D.J.** 1999. Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales. *Vet. Microbiol.* 69:227-37.

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

**VILCEK, S.; GREISER-WILKE, I.; DURKOVIC, B.; OBRITZHUSER, W.; DEUTZ, A.; KOFER, J.** 2003. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea virus from the Southeast of Austria (Styria). *Vet. Microbiol.* 91:285-291.

**VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M.; PATON, D.J.** 2005. Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev. Vet. Med.* 72:31-35.

**WALZ, P.H.; BELL, T.G.; WELLS, J.L.; GROOMS, D.L.; KAISER, L.; MAES, R.K.; BAKER, J.C.** 2001. Relationship between degree of viremia and disease manifestations in calves with experimentally induced bovine viral diarrhoea virus infection. *Am. J. Vet. Res.* 62:1095-103.

**WALZ, P.H.; GROOMS, D.L.; BELL, T.G.; KAISER, L.; BAKER, J.C.; BROCK, K.V.** 2005. Platelet function and association of bovine viral diarrhoea virus with platelets of persistently infected cattle. 1: *Am. J. Vet. Res.* 66:1738-42.

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

**WOLFMAYER, A.; WOLF, G.; BEER, M.; STRUBE, W.; HEHNEN, H-R.; SCHMEER, N.; KOODEN, O-R.** 1997. Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch. Virol.* 142:2049-2057.

**XIA, H.; LIU, L.; WAHLBERG, N.; BAULE, C.; BELÁK, S.** 2007. Molecular phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus: a Bayesian approach. *Virus. Res.* 130:53-62.

**XU, J.; MENDEZ, E.; CARON, P.R.; LIN, C.; MURCKO, M.A.; COLLETT, M.S.; RICE, C.M.** 1997. Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* 71:5312-22.

**XU, X.; ZHANG, Q.; YU, X.; LIANG, L.; XIAO, C.; XIANG, H.; TU, C.** 2006. Sequencing and comparative analysis of a pig bovine viral diarrhea virus genome. *Virus Research* 122:164-170.

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

**YESILBAG, K.; FORSTER, C.; BANK-WOLF, B.; YILMAZ, Z.; ALKAN, F.; OZKUL, A.; BURGU, I.; CEDILLO ROSALES, S.; THIEL, H-J.; KONIG, M.** 2008. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV-1. *Vet. Microbiol.* 130:258-267.

**YU, I.I.; ISKEN, O.; GRASSMANN, C.W.; BEHERENS, S.E.** 2000. A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J. Virol.* 74:5825-35.