



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



**DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLADOS
CHILENOS DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) POR FILOGENIA
MOLECULAR DE LA REGIÓN 5' NO CODIFICANTE DEL GENOMA VIRAL**

ASTRID PÍA DONOSO GUERRERO

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

PROFESOR GUÍA: JOSÉ PIZARRO LUCERO

**SANTIAGO - CHILE
2009**



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



**DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLADOS
CHILENOS DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) POR FILOGENIA
MOLECULAR DE LA REGIÓN 5' NO CODIFICANTE DEL GENOMA VIRAL**

ASTRID PÍA DONOSO GUERRERO

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: JOSÉ PIZARRO LUCERO
PROFESOR CONSEJERO: MARÍA O. CELEDÓN V.
PROFESOR CONSEJERO: LUIS MORAGA

**SANTIAGO - CHILE
2009**

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos aquellos que hicieron posible, ya sea directa o indirectamente, la realización de este trabajo.

Primero que todo agradecer a mi profesor guía, Dr. José Pizarro, por todo su apoyo y su muy buena disposición a enseñar y ayudar. A la Dra. María Orfelía Celedón por todo lo que significó su guía y consejos en el trabajo práctico del laboratorio, y a todos quienes trabajan en el Laboratorio de Virología, a Maricruz, Elcira y tesistas, quienes me entregaron mucho cariño y alegraban las largas jornadas de trabajo en el laboratorio.

Quiero agradecer también a quienes forman parte de mi tesoro más grande en esta vida, mi familia. A mis padres Claudio y Luisa por todo su amor, apoyo, paciencia y buenas energías que me brindaron cada día, que me incentivaron siempre a ser positiva y vencer todos los obstáculos que aparecían. A mis hermanos Larisa y Tomás por su cariño y compañía, y a mi tía Luchita, por ser otro pilar en mi vida, con su amor y ayuda irremplazable.

Y por último no puedo dejar de mencionar a mis mascotas, la Nacha, Piru, Gastón y uno que ya no está conmigo, "el Sombra", por inspirar mis pasos en este largo, pero increíble camino a mi titulación.

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD.....	4
2.1.1 Infección Postnatal.....	6
2.1.1.1 Infección subclínica.....	6
2.1.1.2 Diarrea Viral Bovina.....	6
2.1.1.3 Inmunosupresión.....	7
2.1.1.4 Síndrome Hemorrágico	8
2.1.1.5 Enfermedad de las Mucosas	8
2.1.2 Síndrome clínico en individuos con infección prenatal	9
2.1.2.1 Infección entre -9 y 100 días de gestación	9
2.1.2.2 Infección entre 100 y 150 días de gestación	10
2.1.2.3 Infección después de los 150 días de gestación	11
2.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS	11
2.3 VARIABILIDAD GENÓMICA, ANTIGÉNICA Y BIOLÓGICA DEL VDVB ...	13
2.4 BASES GENÉTICAS DE LA VIRULENCIA DEL VDVB	17
2.5 SITUACIÓN EN CHILE	21
OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODO	24
3.1 MUESTRAS	24

3.2 CULTIVO DE CÉLULAS MDBK	25
3.3 CULTIVOS PRIMARIOS DE PULMONES FETALES BOVINOS	25
3.4 MULTIPLICACIÓN VIRAL	26
3.5 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD) DEL VDVB	27
3.6 SERONEUTRALIZACIÓN	28
3.7 AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DE LA REGIÓN 5'NCR DEL GENOMA VIRAL	29
3.7.1 Extracción de ARN desde lisados celulares infectados con el VDVB	29
3.7.2 Amplificación por RT-PCR de la región 5'NCR del genoma de VDVB	30
3.7.3 Electroforesis en gel de agarosa	30
3.8 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN 5'NCR DEL GENOMA DE VDVB	31
3.8.1 Purificación del amplicón desde la reacción de RT-PCR	31
3.8.2 Cuantificación del amplicón purificado	32
3.8.3 Clonación del amplicón purificado en el vector pGEM-T Easy	32
3.8.4 Obtención del plasmidio purificado	33
3.9 FILOGENIA MOLECULAR DE LA REGIÓN 5'NCR DEL GENOMA DE VDVB	35
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSIÓN	44
6. CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51

RESUMEN

El virus diarrea viral bovina (VDVB) es el agente causal del complejo Diarrea Viral Bovina/ Enfermedad de las Mucosas y otros cuadros clínicos, que generan importantes pérdidas económicas en la industria del bovino.

El VDVB presenta una gran variabilidad genómica, que ha llevado a clasificarlo en dos genotipos (1 y 2). En el genotipo VDVB-1 se identifican 15 subgrupos virales (1a-1o) y en el genotipo VDVB-2 sólo dos (2a y 2b).

En Chile, el virus presenta una amplia disseminación, con prevalencias serológicas de un 69,2% en la Región de la Araucanía, De los Ríos y De los Lagos y de un 59,7% y 86% en bovinos de leche y de carne de la Región Metropolitana respectivamente.

El objetivo de esta memoria fue determinar la composición genética de los virus del VDVB que infectan a los bovinos en Chile. Para ello, a cuarenta y cinco virus obtenidos desde distintas regiones de Chile se procedió a establecer su parentesco genético por filogenia molecular de la región 5' no codificante (5'NCR) del genoma viral. Los resultados indican que cuarenta virus pertenecen al genotipo VDVB-1 y cinco al genotipo VDVB-2. En el genotipo VDVB-1, 2 virus pertenecen al subgrupo VDVB-1a, quince al VDVB-1b, veinte al VDVB-1j y tres al VDVB-1i, siendo este último subgrupo detectado por primera vez en Chile. Todos los virus del genotipo VDVB-2 pertenecen al subgrupo VDVB-2a.

Los resultados permiten concluir que los virus del VDVB que circulan actualmente en el ganado bovino de Chile presentan una alta variabilidad genómica y su composición genética es muy similar a la de los virus presentes en Argentina.

SUMMARY

The Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) is the causative agent of the Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease Complex and other clinical syndromes that causes important economical losses in the bovine industry.

The BVDV shows a high genetic variability with two genotypes (1 and 2). Into genotype 1 has been identified fifteen viral subgroups (1a-1o) and two subgroups into genotype BVDV-2 (2a and 2b).

In Chile, BVDV is widely spread, with a serological prevalence of 69.2% in Región de la Araucanía, De los Ríos y De los Lagos and 59.7% and 86% in dairy and beef herd of Región Metropolitana, respectively.

The purpose of this work was to know the genetic variability of the BVDV viruses that infect cattle in Chile. For this, forty-five isolates were obtained from bovines on different regions from Chile. The 5'-untranslated (5'UTR) region of these viruses was sequenced and the genetic relationship between them was established by molecular phylogeny. The results showed that forty isolates belong to genotype 1 (BVDV-1) and five to genotype 2 (BVDV-2). Of the BVDV-1 genotype, two isolates belong to subgroup BVDV-1a, fifteen to BVDV-1b, twenty to BVDV-1j and three to BVDV-1i. The subgroup BVDV-1i was detected for the first time in Chile. All the viruses of the genotype 2 belong to subgroup BVDV-2a.

It is concluded that BVDV viruses infecting bovines in Chile actually show a high genetic variability and the genetic composition is very similar to the viruses infecting bovines in Argentina.

1. INTRODUCCIÓN

El virus diarrea viral bovina (VDVB), virus que pertenece al género *Pestivirus* de la familia Flaviviridae, es el agente causal del complejo Diarrea Viral Bovina/Enfermedad de las Mucosas (DVB/EM), el cual se encuentra diseminado en todo el mundo con una prevalencia serológica que fluctúa entre un 50 y 90%, según predios y edad de los animales.

La infección con el VDVB puede ser subclínica o producir enfermedades agudas de diversa consideración. El VDVB se reconoce como una de las causas principales de pérdidas económicas en el ganado bovino, por el efecto detrimental del virus en la producción de leche, rendimiento reproductivo, retardo en el crecimiento y aumento de la incidencia de otras enfermedades, entre otras.

El VDVB presenta una gran variabilidad genómica, expresada a través de una alta frecuencia de mutaciones puntuales y recombinaciones genómicas. La variabilidad genómica también se expresa en el comportamiento biológico y antigénico del virus, que explicaría en parte las distintas patologías causadas por el VDVB.

En Chile, el virus se aisló por primera vez en 1985, desde un brote de EM en la zona sur del país. Estudios serológicos dan cuenta de una amplia diseminación del virus en el país, con una prevalencia serológica de un 69,2% en la IX y X región del país y de un 59,7% y 86% en bovinos de leche y de carne de la Región Metropolitana.

En Chile, se ha establecido la existencia de cepas de VDVB pertenecientes a los genotipos VDVB1 y VDVB2 y a los subgrupos VDVB1a, VDVB1b y VDVB1j.

En esta memoria de título se determinó la variabilidad genética de aislados chilenos del VDVB por filogenia molecular de la región 5'NCR del genoma viral.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El Virus de la Diarrea viral Bovina fue aislado por primera vez en Estados Unidos el año 1946, asociado a epizootias de una enfermedad aguda y a menudo fatal (Olafson *et al.*, 1946). El nombre del virus se asignó debido a las principales manifestaciones de la enfermedad que presentaba el ganado, con diarreas y lesiones erosivas en el tracto digestivo (Baker, 1990).

Desde su aislamiento inicial, el conocimiento del virus ha avanzado enormemente, estableciéndose la gran complejidad del virus tanto en sus características epidemiológicas como patógenas.

De hecho, el virus no sólo afecta al ganado bovino, sino que también a otras especies, entre las cuales están los porcinos, ovinos, caprinos, camélidos sudamericanos, además de rumiantes silvestres como el pudú, ciervo, ñu, alce, especies que, además de actuar como reservorio para el virus, presentan cuadros clínicos similares a los bovinos (Moening, 1990; Nettleton, 1990).

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

La infección con el VDVB en bovinos puede ser asintomática o generar una gran diversidad de cuadros clínicos (Copari *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1994). Esto depende de factores asociados al agente, hospedador y medio ambiente.

Entre los factores asociados al hospedador está el estado inmune del animal con respecto al virus (inmunotolerancia o inmunocompetencia), con inmunidad pasiva a través de anticuerpos colostrales o activa por exposición al agente o a vacunación; estado de preñez de la hembra; edad de gestación del feto al momento de la

infección; nivel de estrés medio ambiental al momento de la infección y coinfección con otros patógenos (Bolin y Grooms, 2004).

Entre los factores asociados al agente, el principal es el grado de virulencia de los diferentes aislados virales (Bolin y Grooms, 2004). Esto se ha observado al infectar experimentalmente animales con cepas no citopáticas (NCP) de distinta virulencia de los genotipos VDVB-1 y VDVB-2. Los animales infectados con las cepas de mayor virulencia, en general presentan mayor viremia y un cuadro clínico más grave. Esto se explica por una replicación más eficiente del virus en el animal (Bolin y Ridpath, 1992; Walz *et al.*, 2001).

El virus puede ser transmitido vía horizontal o vertical. En la vía horizontal (postnatal) el virus infecta a un animal a través de la inhalación o ingestión de productos contaminados con saliva, descarga oculonasal, uterinas o fluidos amnióticos, leche, semen, orina, heces o sangre procedente de animales infectados. También existe la posibilidad de infección por la administración parenteral de productos biológicos contaminados, picaduras de insectos hematófagos, empleo de agujas hipodérmicas contaminadas, palpación rectal, inseminación e implantación de embriones procedentes de animales infectados y a través de todo implemento contaminado que tome contacto con las mucosas de un animal susceptible (Baker, 1987).

La otra forma existente de transmisión es la vertical (infección prenatal) en la cual el virus se transfiere desde la madre gestante al feto, esto debido a que el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria (Baker, 1990; Brownlie, 1990).

El VDVB es un patógeno del tracto digestivo, pero también provoca cuadros respiratorios, problemas reproductivos, afectando también al tracto circulatorio, linfático, musculoesquelético, sistema nervioso central y generando síndromes

hemorrágicos, además de predisponer a los animales a la presentación de otras patologías infecciosas debido a su efecto inmunosupresor (Baker, 1987; Baker, 1990; Corapi *et al*, 1990; Bolin y Grooms, 2004).

2.1.1 Infección postnatal

2.1.1.1 Infección subclínica

Entre el 70 y 90% de los animales susceptibles inmunocompetentes infectados con el VDVB presentan este tipo de infección (Baker, 1990). Pueden presentar una elevación de la temperatura corporal y leucopenia, desarrollando posteriormente anticuerpos neutralizantes específicos. Las infecciones subclínicas explicarían los anticuerpos neutralizantes para VDVB que se encuentran en la mayoría del ganado no vacunado (Bolin y Grooms, 2004).

2.1.1.2 Diarrea viral bovina

Es una enfermedad aguda que se presenta en el ganado seronegativo inmunocompetente. Ocurre en rangos de edad que van desde los 6 meses a 2 años de edad, siendo la morbilidad alta, pero la mortalidad baja o nula. El período de incubación va entre los 5 y 7 días, seguida por fiebre transitoria y leucopenia. La viremia ocurre 4 a 7 días postinfección y en algunos casos persiste por 15 días (Baker, 1990).

Los signos clínicos incluyen depresión, anorexia, descarga oculonasal y ocasionalmente lesiones orales caracterizadas por erosiones y ulceraciones superficiales. Un cuadro diarreico también puede estar presente y en ganado lechero la producción láctea tiende a disminuir. Los anticuerpos neutralizantes generalmente aparecen entre las 2 y 4 semanas post infección y probablemente persisten de por

vida. La respuesta inmune puede tener una larga duración, pero los individuos son susceptibles a reinfecciones (Baker, 1990).

2.1.1.3 Inmunosupresión

El VDVB es capaz de alterar la respuesta inmune del animal ya que afecta la función de los neutrófilos, causa hiporespuesta de los linfocitos periféricos a diversos mitógenos y afecta la distribución de las inmunoglobulinas entre el citoplasma y la superficie de los linfocitos. Esto impide la eliminación de bacterias desde la sangre, permite una mayor diseminación de la infección del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB) en diversos tejidos, potenciando la acción de otros patógenos (sinergismo) tales como el virus de la parainfluenza tipo 3, coronavirus, rotavirus, *Pasteurella* spp, *Salmonella* spp, coccidias, *Escherichia coli*, entre otras (Baker, 1990; Bolin y Grooms, 2004).

La inmunosupresión lleva a un cuadro clínico más grave que el provocado sólo por el agente infeccioso que coinfecta con el VDVB (Baker, 1990; Reinhardt, 1992).

2.1.1.4 Síndrome Hemorrágico

Este tipo de cuadro se describe a partir de la década de los '90. El mecanismo no está muy claro, pero se cree que es por un efecto directo sobre las plaquetas circulantes más que por un efecto de disminución de la blastogénesis en la médula ósea (Corapi *et al.*, 1990; Bolin y Ridpath, 1992).

El cuadro se caracteriza por diarrea hemorrágica, fiebre, epistaxis, sangramiento de los sitios de inyección y una severa trombocitopenia. También se han observado petequias y equimosis diseminadas en la conjuntiva, mucosa bucal,

tejido subcutáneo, peritoneo visceral y parietal mesenterio, pared del rumen, intestino, riñones, bazo, vejiga urinaria, entre otros tejidos (Corapi *et al.*, 1990).

2.1.1.5 Enfermedad de las mucosas

Esta forma de presentación se presenta sólo en animales portadores inmunotolerantes del VDVB (PI), cuando en el período postnatal el animal se infecta con una cepa citopática (CP) del VDVB.

En la forma aguda de la enfermedad el animal PI se sobreinfecta con una cepa CP antigénicamente idéntica o muy similar al virus no citopático (NCP) que había infectado al animal durante su gestación (cepa homóloga) (Baker, 1990).

En la forma crónica de la enfermedad de las mucosas el animal se sobreinfecta con una cepa CP antigénicamente no tan similar a la cepa NCP que está infectando al animal (cepa heteróloga).

La diferencia que existe entre ambos tipos de enfermedad de las mucosas, está en el curso de la enfermedad, siendo mucho más lenta la forma crónica, pero en ambos casos el 100% de los animales que presentan la enfermedad mueren (Baker, 1990).

La enfermedad de las mucosas, se caracteriza por la aparición repentina de signología clínica en animales entre 6 a 24 meses de edad, que se infectaron en la etapa temprana de su vida embrionaria. Su morbilidad es baja, pero la letalidad es de un 100%. Los animales se presentan decaídos, anoréxicos, con taquicardia, polipnea y sialorreicos. La temperatura oscila entre 40-41° C. Los movimientos ruminales habitualmente se encuentran ausentes y luego de 2 a 4 días del inicio de la signología se produce una diarrea profusa y acuosa (Reinhardt, 1992).

2.1.2 Síndromes clínicos en individuos con infección prenatal

La infección por este virus en una hembra preñada generalmente lleva a una infección subclínica, sin embargo el mayor impacto de esta infección está en la capacidad del virus de atravesar la barrera placentaria, causando vasculitis en el lado materno de la placenta, infectando al feto (Baker, 1990; Fredriksen *et al.*, 1999). El efecto que tenga el virus en el feto dependerá del tiempo de gestación de la hembra, desarrollo del sistema inmune del feto, biotipo de la cepa infectante y virulencia del virus (Duffel y Harkness, 1985; Brownlie, 1990; Grooms, 2004).

2.1.2.1 Infección entre -9 y 100 días de gestación

El porcentaje de preñez en animales infectados con el virus es menor que en animales libres de este (Dubovi, 1994). Dentro del grupo de animales positivos al virus, la tasa de preñez también se ve influenciada si la infección ocurrió antes, durante o después de la cruce, siendo más baja después de la cruce. El efecto del virus puede ser por un daño directo sobre el ovocito o indirecto a través de un daño en el medio ambiente en el cual este se desarrolla (Grooms, 2004).

Los efectos de la infección con VDVB son muerte fetal, seguida de aborto o momificación, ocurriendo en cualquier etapa de la gestación, pero es más común durante el primer trimestre. La expulsión del feto puede ocurrir varios meses después de la infección (Casaro *et al.*, 1971 ; Done *et al.*, 1980; Duffell y Harkness, 1985; Roeder *et al.*, 1986; Baker, 1990; Brownlie, 1990; Sprecher *et al.*, 1991).

2.1.2.2 Infección entre 100 y 150 días de gestación

La infección de los fetos en este periodo puede resultar en defectos congénitos, pues involucra la etapa final de la organogénesis del sistema nervioso,

como también la habilidad fetal de montar una respuesta inflamatoria. Lesiones teratogénicas a nivel del sistema nervioso incluyen microencefalopatía, hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, hipomielinogénesis. A nivel de sistema inmune puede provocar aplasia tímica, defectos oculares como atrofia retinal, neuritis óptica, cataratas, microftalmia, displasia retinal, entre otras anomalías (Roeder *et al.*, 1986; Radostits y Littlejohns, 1988; Baker, 1990).

La maduración de la respuesta inmune ocurre alrededor de los 125 días de gestación. Por lo tanto, los fetos que sobreviven a la infección con VDVB no citopático entre los 18 y 125 días de gestación invariablemente desarrollan inmunotolerancia al virus y subsecuentemente nacen como animales portadores inmunotolerantes (PI) (Grooms, 2004). La significancia del biotipo se evidencia claramente durante este periodo fetal, pues la infección con cualquier biotipo es capaz de causar pérdida fetal, pero sólo el biotipo NCP puede generar animales PI, que son el reservorio del virus en la población animal (Dubovi, 1994).

Los animales PI pasan desapercibidos y son la fuente más importante para la perpetuación de la infección (Radostits y Littlejohns, 1988).

2.1.2.3 Infección después de los 150 días de gestación

El impacto del VDVB en etapas más tardías de gestación es considerablemente menor que en periodos más tempranos. El feto se encuentra inmunológicamente competente y raramente causa malformaciones congénitas. El animal puede ser normal al nacimiento y tener anticuerpos neutralizantes para el VDVB, previo a la ingesta de calostro (Baker, 1990; Dubovi, 1994).

2.2 CARACTERISTICAS DEL VIRUS

El VDVB pertenece al género *Pestivirus* de la familia Flaviviridae junto con el virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC), el virus de la Enfermedad de la Frontera (VEF) y una única cepa (H138) aislada desde una jirafa en Kenya (Murphy *et al.*, 1995; Heinz *et al.*, 2000; Becher y Thiel, 2002).

El virión tiene un diámetro de 30-40 nm, una envoltura lipídica y el genoma está formado por un ARN de hebra simple de polaridad positiva de un tamaño de 12,5 Kb (Boulangier *et al.*, 1992; Lindenbach y Rice, 2001; Lackner *et al.*, 2004).

El genoma presenta en su extremo 5' una región no codificante (5'NCR) de 360-390 pb, seguida de una región que codifica para una poliproteína de aproximadamente 4.000 aminoácidos (ORF), terminando en su extremo 3' con una región no codificante de unos 200 pb, sin el extremo poliadenilado (3'NCR) (Murphy *et al.*, 1995).

La poliproteína es procesada co- y post-traduccionamente por proteasas celulares y virales generando 11-12 proteínas maduras (Lindenbach y Rice, 2001; Lackner *et al.*, 2004). La primera proteína codificada por el genoma viral es Npro, luego de la cual se ubican las proteínas estructurales del virus, formadas por la proteína C, que forma la nucleocápside viral y las glicoproteínas virales Erns, E1 y E2 que se ubican en la envoltura lipídica de la partícula viral (Thiel *et al.*, 1991; Weiland *et al.*, 1999). Los 2/3 restantes de la poliproteína corresponden a las proteínas no estructurales o también llamadas funcionales del virus, denominadas p7, NS2-3 (NS2, NS3), NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Meyers y Thiel, 1996) (Fig.1).

5' ----- 3'

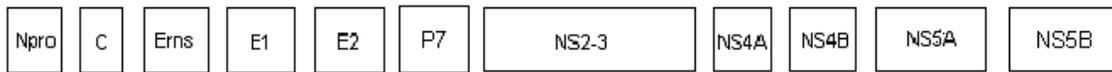


Figura 1: Organización genómica de proteínas *Pestivirus*. Esquema adaptado de “Virus Taxonomy” Murphy *et al.*, (1995). Pag. 422.

2.3 VARIABILIDAD GENÓMICA, ANTIGÉNICA Y BIOLÓGICA DEL VDVB

El VDVB presenta una gran variabilidad genómica, la que se manifiesta a lo largo de todo el genoma viral, a través de una alta frecuencia de mutaciones puntuales y recombinaciones genómicas (Meyers y Thiel, 1996).

El genoma de los virus ARN presenta altas frecuencias de mutaciones, estimada en aproximadamente 1 cada 10^4 pares de bases (Bolin y Grooms, 2004). La alta frecuencia de mutaciones puntuales es atribuida principalmente a errores cometidos por la ARN polimerasa viral responsable de la replicación del genoma viral (Bolin y Grooms, 2004). La habilidad para generar constantemente mutaciones permite a los virus ARN adaptarse rápidamente a la respuesta del hospedero y, en algunos casos, establecer infecciones persistentes o crónicas (Domingo *et al.*, 1998; Chaston y Lidbury, 2001).

Por otra parte, se ha observado una gran ocurrencia de recombinación genómica en la región codificante de la proteína no estructural NS2-3 del VDVB no citopático, con la inserción de ARN viral o celular. El virus CP resultante posee un genoma esencialmente idéntico al del virus NCP original, a excepción de la inserción del ARN adicional (Bolin y Grooms, 2004).

Análisis de las secuencias nucleotídicas del genoma viral indican que la región más conservada de éste es la región 5'NCR y la más variable es la del gen que codifica para la glicoproteína E2 (Paton *et al.*, 1994; Vilcek *et al.*, 1999).

Las regiones del genoma más frecuentemente usadas para análisis genético (tipificación) del VDVB son las regiones 5'NCR y la región inmediatamente adyacente, que codifica para la proteína viral N^{pro} (Bolin y Grooms, 2004).

Al comparar las secuencias nucleotídicas de la región 5'NCR de distintos aislados virales se los pudo clasificar en dos genogrupos o genotipos, el VDVB1 y el VDVB2 (Pellerin *et al.*, 1994). El genotipo VDVB-1 agrupa a las principales cepas de laboratorio como las cepas NADL, Singer y C24V. Es de distribución mundial y en general agrupa a aquellos aislados que provocan cuadros clínicos leves. El genotipo VDVB-2 agrupa además de aislados asociados a cuadros clínicos leves, a todos los aislados virales asociados al síndrome hemorrágico y diarreas graves en animales adultos inmunocompetentes, pero a excepción de Norteamérica, se encuentra muy poco diseminado en el ganado bovino mundial, considerándose un virus emergente (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994).

Dentro de los genotipos, se han podido identificar grupos de virus genéticamente más similares llamados “subgrupos” y dentro de estos subgrupos, agrupaciones de virus más similares aún, denominados “clusters”. Estudios hasta el año 2004 daban cuenta de la existencia de 11 subgrupos dentro del VDVB-1 (1a-1k) (Vilcek *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2004), pero recientemente nuevos análisis han permitido identificar dentro del genotipo VDVB-1 cuatro subgrupos adicionales, VDVB-1l al 1o (Jackova *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2008; Yesilbag *et al.*, 2008).

Para el genotipo VDVB-2 es posible identificar hasta ahora dos subgrupos, VDVB-2a y 2b (Tajima *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2002; Vilcek *et al.*, 2005).

La variabilidad genómica del VDVB tiene un correlato en el comportamiento antigénico y biológico del virus, que explicaría al menos en parte las distintas patologías asociadas al virus (Bolin y Ridpath, 1992).

En el aspecto antigénico del VDVB, el virus posee un único serotipo, sin embargo por ensayos de neutralización viral con anticuerpos monoclonales y policlonales, se ha establecido la existencia de importantes variabilidades antigénicas entre distintos aislados del VDVB, siendo mayores entre aislados del genotipo VDVB-1 y VDVB-2, lo que incluso permite discriminar a ambos genotipos con anticuerpos monoclonales (Corapi *et al.*, 1990; Xue *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 1995; Couvreur *et al.*, 2002). Algunos anticuerpos monoclonales son capaces de unirse a aislados virales de un genotipo y no son capaces de unirse a los aislados virales del otro genotipo (Ridpath *et al.*, 1994). Esto explicaría por qué en Estados Unidos, pese al uso de vacunas por más de 30 años aún el ganado bovino no esté protegido eficientemente frente a infecciones con el VDVB (Bolin *et al.*, 1991; Bolin y Ridpath, 1995; Van Oirschot *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 2003).

Con respecto a las características biológicas del VDVB, existen dos biotipos del virus en la naturaleza, el biotipo CP y el biotipo NCP, determinado por la capacidad del virus de provocar efecto citopático y muerte celular en cultivos celulares (Bolin y Grooms, 2004).

El virus citopático provoca vacuolización del citoplasma y muerte celular a pocos días de infección, en cambio el virus no citopático, el más prevalente en la naturaleza y virus parental del virus citopático, no provoca daño celular visible (Bolin y Grooms, 2004).

Estas diferencias entre ambos biotipos se deben a que las cepas NCP inhiben la síntesis de interferón alfa-beta en las células infectadas lo que impide la lisis de las

células, en cambio las cepas CP no inhiben esta síntesis lo que lleva a las células a entrar en apoptosis con la consiguiente lisis celular (Charleston *et al*, 2001; Schweizer y Peterhans, 2001; Iqbal *et al*, 2004). También se ha visto que en células dendríticas y monocitos, los dos biotipos son capaces de infectar a ambos tipos celulares, pero únicamente el biotipo CP es capaz de destruir el 90% de los monocitos infectados (Brackenbury *et al.*, 2003; Glew *et al.*, 2003).

Además, cepas CP y NCP homólogas han demostrado diferencias entre ellas en las características de la infección que llevan a cabo en animales infectados. Animales infectados con las cepas NCP generan una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes que las infecciones con cepas CP, siendo también las cepas NCP capaces de infectar una amplia variedad de tejidos, como por ejemplo tejidos del tracto respiratorio, células sanguíneas, bazo, entre otras. Mientras que las cepas CP infectan sólo algunos tipos de tejidos, principalmente tejido linfático del tracto digestivo (Lambot *et al.*, 1998).

Estudios recientes realizados en glóbulos blancos circulantes han llevado a postular la existencia de tres biotipos del VDVB: un biotipo NCP (en células epiteliales y linfoides), un biotipo CP (con muerte de células epiteliales y linfoides) y un nuevo biotipo linfocitopatogénico (NCP en células epiteliales, pero CP y con muerte de células linfoides). Los virus del biotipo linfocitopatogénico no generan en las células los mismos marcadores moleculares producidos por el biotipo CP (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 CP del VDVB (Ridpath *et al.*, 2006). Además, los virus del biotipo linfocitopatogénico tienen una alta virulencia en animales infectados.

Por otra parte, 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 VDVB 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).

2.4 BASES GENÉTICAS DE LA VIRULENCIA DEL VDVB

Dentro de las variables que determinan el efecto de la infección por el VDVB en un animal se encuentra la virulencia del aislado viral. En campo se ha visto que los aislados del VDVB presentan distintas virulencias. Así, mientras la infección de un adulto inmunocompetente con un virus de baja virulencia generalmente cursa de forma subclínica, infecciones con virus de alta virulencia van a provocar un cuadro clínico, que en algunos casos provoca una alta mortalidad en los animales infectados (Baker, 1990; Corapi *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1994).

Investigaciones realizadas con cepas NCP de distintas virulencias del VDVB, han mostrado diferencias en el tropismo celular. Las cepas asociadas al síndrome hemorrágico por ejemplo, son capaces de infectar y multiplicarse en trombocitos, lo que no ocurre con cepas clásicas del VDVB (Corapi *et al.*, 1990).

Por otra parte, al infectar experimentalmente animales con cepas NCP de distinta virulencia de los genotipos VDVB-1 y VDVB-2 del virus, se ha observado que los animales infectados con cepas de mayor virulencia presentan una mayor viremia. Esto se explicaría por una replicación más eficiente del virus en el animal (Bolin y Ridpath, 1992; Walz *et al.*, 2001). Sin embargo, independiente de la virulencia, en general, ambos genotipos infectan los mismos tipos de tejidos, pero los aislados del

genotipo VDVB-2 se encuentran en mayor cantidad en la sangre (viremia) y en tejidos, que los aislados del genotipo VDVB-1 (Walz *et al.*, 2001).

Otros autores han observado que al infectar animales con cepas virales de distinta virulencia del genotipo VDVB-2, todas ellas infectan los mismos tipos de tejidos, pero las cepas más virulentas generan una mayor viremia, más prolongadas y las lesiones en el sistema linfático y digestivo son más severas, sugiriendo diferencias en la capacidad de provocar daño en los tejidos (Kelling *et al.*, 2002; Liebler-Tenorio *et al.*, 2002).

En otros estudios realizados con cepas del virus PPC, se han demostrado diferencias en la liberación de partículas virales de la progenie desde las células infectadas. Así, a medida que aumenta la virulencia de las cepas, aumenta la razón viriones libres (extracelulares) / viriones asociados a células (intracelulares), lo que indicaría que una mayor proporción de la progenie como virus libres haría a algunas cepas más virulentas (Mittelholzer *et al.*, 2000).

Un punto importante de mencionar es la asociación que se ha hecho en los últimos años entre algunos cuadros clínicos y determinados genotipos y subgrupos virales. Así, se sugiere que los virus que pertenecen al genotipo VDVB-2 tendrían una mayor capacidad de provocar abortos en los bovinos, en comparación con los virus que pertenecen al genotipo VDVB-1 (Evermann y Ridpath, 2002). Por otra parte, los virus de los subgrupos VDVB-1b y VDVB-1d estarían asociados preferentemente a cuadros respiratorios (Baule *et al.*, 2001; Fulton *et al.*, 2002).

Estas diferencias en la virulencia de virus de distintos genotipos y subgrupos virales, lleva a pensar en la posibilidad de la existencia de caracteres genómicos conservados en los distintos grupos virales, que se expresaría en diferencias en la infección viral de las cepas.

La región 5'NCR del VDVB, es la región más conservada del genoma viral debido a su importante rol como sitio de unión ribosomal para la síntesis de la poliproteína viral, como también para el inicio de la replicación del genoma viral y su encapsidación en la progenie viral (Poole *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2000).

Se ha visto que mutaciones en esta zona producen virus con una infectividad disminuida, expresada en una menor síntesis de genoma viral, menor síntesis de progenie viral y 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*, con una menor viremia y un cuadro clínico más leve en animales infectados (Makoschey *et al.*, 2004).

Estudios realizados con aislados de campo de distinta virulencia han demostrado que en algunos casos esta virulencia se asocia a diferencias en la eficiencia traduccional de la región 5'NCR (Topliff *et al.*, 2005).

La región 3'NCR se ha visto que también es una región crucial para la eficiencia de la replicación y traducción viral, actuando específicamente a nivel de la replicación del ARN viral y de la terminación de la traducción viral (Isken *et al.*, 2004). Estudios realizados en otros flavivirus han demostrado que mutaciones en esta región 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).

N^{pro} es una autoproteasa que en el VPPC se ha visto que interfiere en la síntesis de interferón tipo I, aumentando la resistencia de la célula infectada a la apoptosis (Ruggli *et al.*, 2003). Deleciones en el gen que codifica esta proteína produce una atenuación del virus, induciendo una disminución en la multiplicación del virus en las células del hospedero (Mayer *et al.*, 2004; Tratschin *et al.*, 1998).

Erns es una glicoproteína con actividad ribonucleasa, indispensable para el ciclo infectivo viral (Meyers y Thiel, 1996). En el VDVB inhibe la actividad del interferón tipo I por ARN de hebra doble, mecanismo clave de la respuesta inmune innata frente a las infecciones virales (Schweizer y Peterhans, 2001; Baigent *et al.*, 2002; Iqbal *et al.*, 2004; Lackner *et al.*, 2004; Lackner *et al.*, 2005).

E2 es la proteína mayoritaria de la partícula viral y juega un rol preponderante en la respuesta inmune del hospedero, ya que posee los principales epitopos en la generación de anticuerpos neutralizantes (Horzinek, 1990; Xue *et al.*, 1990; Boulanger *et al.*, 1992). Esta glicoproteína, una proteína de fusión de clase II y el principal receptor viral, se ha visto que es un importante determinante de la virulencia en el VPPC (Garry y Dash, 2003; Risatti *et al.*, 2005). La glicoproteína E2 de una cepa atenuada del VPPC fue responsable de una menor síntesis de progenie viral y de la formación de placas de infección más pequeñas en cultivos celulares, que una cepa más virulenta del VPPC (Risatti *et al.*, 2005).

In vivo, se ha observado que la glicoproteína E2 de una cepa atenuada fue responsable de una menor diseminación de la infección, una menor replicación viral en tejidos, una menor viremia y un cuadro clínico más leve y de menor duración en los cerdos infectados que la observada con la glicoproteína E2 de la cepa más virulenta (Risatti *et al.*, 2005).

En los virus NCP la proteína NS2-3 siempre se encuentra como una molécula única, en cambio, en los virus CP, NS2-3 se encuentra parcialmente procesada generando NS2 y NS3, encontrándose en el citoplasma celular NS2-3, NS2 y NS3 (Meyer y Thiel, 1996). Sin embargo, estudios recientes indican que a tiempos tempranos de la infección viral, la proteína NS2-3 tiene la capacidad de autoprocresarse, generando las proteínas NS2 y NS3 tanto en los virus CP como NCP

(Bolin y Grooms, 2004; Lackner *et al.*, 2004). La diferencia entre ambos biotipos virales está en los tiempos más tardíos de la infección viral, en que los virus NCP dejan de autoprocasar a NS2-3, lo que no ocurre con los virus CP. La proteína NS-3 es considerada la molécula marcadora del virus CP, causando el efecto citopático (Donis y Dubovi, 1987).

La eficiencia de la síntesis del ARN viral depende del autoprocasamiento de NS2-3, indicando que NS2-3 es importante para el control de la replicación y patogenicidad del VDVB (Lackner *et al.*, 2004).

2.5 SITUACIÓN EN CHILE

El estudio genómico de aislados nacionales del VDVB ha permitido establecer la presencia en Chile de los dos genotipos virales (VDVB1/VDVB2) y de los subgrupos 1a, 1b y 1j del genotipo VDVB1 (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

Análisis por seroneutralización cruzada han permitido clasificar a los aislados virales chilenos en al menos 4 grupos antigénicos distintos, con baja o ninguna antigenicidad cruzada entre ellos (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006). Cabe destacar que aislados virales nacionales pertenecientes a los subgrupos VDVB1j y VDVB2 presentan una baja antigenicidad cruzada con la cepa NADL, utilizada ampliamente como cepa vacunal en las vacunas que comercializan los laboratorios internacionales.

Por otro lado, los aislados virales nacionales si bien presentan el mismo tropismo celular y similar eficiencia de síntesis de progenie viral por ciclo infeccioso, presentan diferencias importantes a nivel de la eficiencia y diseminación de la infección, duración del ciclo infeccioso y número de ciclos infecciosos a 30 horas de infección en cultivos celulares (Montt, 2004). Esto sugiere la existencia de cepas con distinta virulencia, por distintas eficiencias en la infección de los animales.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta memoria de título se profundizará el estudio sobre la variabilidad genética de aislados chilenos del VDVB. Para ello, aislados nacionales del virus asociados a distintos cuadros clínicos y zonas geográficas de Chile se analizarán genéticamente por filogenia molecular de la región 5'NCR del genoma viral.

OBJETIVOS

General

- Conocer la variabilidad genética de aislados chilenos del VDVB por filogenia molecular de la región 5´NCR 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) Amplificar por RT-PCR y secuenciar la región 5´NCR del genoma de los aislados virales.

3) Determinar la variabilidad genética de los aislados del VDVB por filogenia molecular de las secuencias nucleotídicas de la región 5´NCR.

3. MATERIALES Y MÉTODO

3.1 MUESTRAS

Los virus para el análisis genético se aislaron desde muestras de sangre obtenidas a partir de predios ubicados tanto en la zona central (Región Metropolitana, Bernardo O'Higgins y Maule) como en la zona sur del país (región del Biobío, Araucanía, de los Ríos y de los Lagos), regiones que concentran la mayor parte de los predios ganaderos de Chile.

A las muestras de sangre obtenidas de la Región Metropolitana, luego de obtenerse el suero se les realizó la prueba de seroneutralización para determinar el título de anticuerpos seroneutralizantes contra VDVB.

Los animales muestreados presentaban antecedentes que los hacían sospechosos de estar infectados con el VDVB, como por ejemplo aborto, repetición de celo y diarrea. También fueron tomadas muestras de animales sanos o asintomáticos por ser posibles portadores inmunotolerantes del virus.

Algunos virus fueron aislados desde fetos de los mataderos Lo Valledor, RV Limitada y Friosa de la Región Metropolitana, desde los cuales se obtuvieron cultivos primarios de los pulmones fetales.

También se caracterizaron genéticamente aislados virales obtenidos en el proyecto FONDECYT 1970887, las que se encontraban congeladas a -196°C en el laboratorio de Virología de nuestra Facultad.

3.2 CULTIVOS DE CÉLULAS MDBK

Los aislados virales se multiplicaron en monocapas de células epiteliales Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) de bovino, libres de infección por el VDVB.

Células MDBK que se encontraban congeladas en nitrógeno líquido a -196°C fueron sembradas en botellas de 10 ml en medio de cultivo esencial mínimo (MEM) (medio esencial mínimo, N° catálogo GIBCO-INVITROGEN 41500-034) con suero equino al 8%. Las células se incubaron por 72 horas a 37°C hasta obtener una monocapa completa.

Transcurridas las 72 hrs de incubación se eliminó el medio de cultivo, las células se lavaron una vez con 10 ml de solución salina A de Puck (Puck *et al.*, 1961) y una vez con 1 ml de tripsina-verseno (Tripsina 0,05% Verseno 0,02% en Salina A de Puck). 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 100 mil células/ml con medio de cultivo MEM con suero equino 5%.

Para botellas de 10 ml se sembraron 10 ml de la suspensión celular y para tubos, 2 ml de las células, luego de lo cual las células se incubaron a 37°C .

3.3 CULTIVOS PRIMARIOS DE PULMONES FETALES BOVINOS

Los cultivos primarios se realizaron desde pulmones bovinos obtenidos desde fetos provenientes de hembras preñadas sacrificadas en los mataderos RV Limitada, Lo Valledor y Friosa de la Región Metropolitana.

Los pulmones se extrajeron asépticamente desde los fetos y se lavaron en solución salina A de Puck, hasta obtener un sobrenadante limpio. Luego, los órganos se depositaron en placa Petri, se fragmentaron finamente con tijeras y los trozos de pulmón fueron traspasados a un matraz junto con 70 ml de salina A de Puck.

Los trozos de pulmón se agitaron hasta obtener un sobrenadante transparente, luego de lo cual se eliminó el sobrenadante, se agregó 40 ml de tripsina 0,25% y se agitó nuevamente por 20 minutos hasta obtener un sobrenadante opalescente.

Los trozos de pulmón se dejaron decantar por algunos minutos y el sobrenadante se centrifugó a 2.000xg por 5 minutos para sedimentar las células.

El sobrenadante con la tripsina se eliminó y luego de lavar las células con 25 ml de salina A de Puck se centrifugó por otros 5 minutos para sedimentar las células. Finalmente, el sobrenadante se eliminó, las células se resuspendieron en 10 ml. de medio MEM con suero equino 10% y se sembraron en una botella de 10 ml. Las botellas con células se incubaron a 37°C por 48 hrs. después de lo cual se realizaron pasajes celulares.

3.4 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 de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, 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 llevar a cabo un 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 lizar las células y liberar el virus al medio de cultivo. Luego de lo cual se repitió el procedimiento detallado anteriormente, pero ahora 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.

3.5 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD) DEL VDVB.

La presencia del VDVB en las células MDBK se detectó por IFD. Para ello, luego que las células inoculadas se incubaron por 72 horas a 37°C, se procedió a congelarlas/descongelarlas 3 veces, para liberar el virus desde el interior de las células y posteriormente se utilizó para inocular 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, fueron lavadas con PBS 0,01M pH 7,6 por 5 minutos y fijadas con acetona fría al 100% a -20°C 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 Weybridge), 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 pH 7,6 al 0,01 M y luego con agua destilada. Una vez secadas, se dispusieron en un portaobjeto sobre 7 µl de glicerina al 50% y PBS 0,001 M a pH 7,6.

La presencia de antígenos del 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.

3.6 SERONEUTRALIZACIÓN

Esta prueba se realizó agregando a una microplaca de fondo plano (Linbro) 25 μ l de los sueros inactivados (dos pocillos por cada muestra) en las filas A, B y C. Además se adicionaron 25 μ l de MEM en toda la microplaca excepto en la fila B. Posteriormente, por medio de una micropipeta multicanal, se hicieron diluciones en base dos de los sueros, por duplicado, desde 1:2 hasta 1:64 en medio de cultivo, cada una de las cuales se hizo reaccionar con 100 DICT₅₀ de la cepa NADL del VDVB. Después de incubar la mezcla suero-virus a 37°C por una hora se adicionaron 50 μ l de una suspensión de células en una concentración de 150.000 células por ml, adicionando 15% de suero equino. La microplaca se incubó a 37°C en un ambiente con un 5% de CO₂ por 5 días, realizando observaciones diarias en busca de efecto citopático producido por la cepa NADL del VDVB (Edwards, 1990).

El título del suero correspondió a la dilución de suero que protege al 50% de la población de cultivos celulares infectados con 100 DICT₅₀ de VDVB y se obtuvo empleando el método de Reed y Muench (Lennette y Schmidt, 1964).

3.7 AMPLIFICACION POR RT-PCR DE LA REGION 5'NCR DEL GENOMA VIRAL

3.7.1 Extracción de ARN desde lisados celulares infectados con el VDVB.

Las monocapas de células infectadas fueron congeladas y descongeladas tres veces. A 250 μ l del lisado celular se agregó 750 μ l de Trizol LS (Invitrogen), se procedió a pipetear varias veces y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregó 400 μ l de cloroformo y luego de agitar en vortex por 15 segundos se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 12.000xg por 15 minutos.

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 sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 75%, agitando en vortex por 15 segundos y centrifugando a 7.500 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.

3.7.2 Amplificación por RT-PCR de la región 5'NCR del genoma de VDVb.

La región 5'NCR 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 en la reacción fueron: 324 (5'-ATGCCCTTAGTAGGACTAGCA-3' y 326 (5'-TCAACTCCATGTGCCATGTAC-3'), sintetizando un fragmento de ADN de 288 pb.

La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo a 55° 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 (324 y 326, 10 µM cada uno); 2 µl de sulfato de magnesio 5 mM. Luego de la reacción de transcripción inversa, los tubos se incubaron a 94°C por 2 minutos.

La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos y 68°C por 1 minuto. Luego, los tubos se incubaron a 68°C por 5 minutos.

3.7.3 Electroforesis en gel de agarosa

El fragmento de ADN amplificado se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM) con posterior tinción con bromuro de etidio 1 µg/ml.

Para ello, 0,5 gramos de agarosa se fundieron en 25 ml de tampón TBE a 100°C. Después de enfriar a 55°C la solución se vertió en la cubeta de la cámara de electroforesis y se dejó hasta que se solidificara la agarosa. Luego, se agregó tampón TBE hasta cubrir 1 mm la superficie del gel.

Las muestras a cargar en el gel correspondieron a 5 µl de la reacción de RT-PCR y 1 µl de tampón de electroforesis. 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 en el gel se observaron en un transiluminador con luz UV.

3.8 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN 5'NCR DEL GENOMA DE VDVB.

Los amplicones obtenidos desde la región 5'NCR del genoma de VDVB por RT-PCR se purificaron y en caso de tener una concentración mayor de 10 ng/µl se secuenciaron directamente ambas cadenas de ADN, usando los mismos partidores empleados en la reacción de RT-PCR. En aquellos casos en que la concentración del amplicón obtenido fue menor de 10 ng/µl, el amplicón se clonó en el vector pGEM T-Easy, el plasmidio se multiplicó en bacterias *E. coli* y luego se secuenció el amplicón inserto en el plasmidio purificado.

3.8.1 Purificación del amplicón desde la reacción de RT-PCR

Para purificar el amplicón se usó el “kit” QIAquick PCR Purification (Quiagen), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En breve, 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.

3.8.2 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. Para ello, la muestra sometida a electroforesis contenía 1 µl del amplicón purificado, 4 µl de agua y 1 µl de tampón muestra. 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.

3.8.3 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 células competentes JM109 recién descongeladas. Luego se aplicó un shock 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 termorregulado 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 debieran contener al vector sin el inserto.

3.8.4 Obtención del plasmidio purificado

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 que se por 5 minutos a 99°C con posterior centrifugación a 7.500 x g por 15 minutos.

Al lisado bacteriano se le realizó un PCR de colonia para 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, MgCl₂ 1,2 mM, dNTP 0,2 mM, partidor 324 0,4 μM, partidor 326 0,4 μM, Taq Polimerasa Platinum (Invitrogen) 1 U. Las condiciones de amplificación fueron: 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°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 288 pb insertado, 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).

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 agitando 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.

500 µl de solución de lavado se agregó a la columna 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 para eluir el plasmidio. 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.

3.9 FILOGENIA MOLECULAR DE LA REGIÓN 5'NCR 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 (Thompson *et al.*, 1994) . Las distancias genéticas existentes entre ellas se calcularon usando el método de dos parámetros de Kimura y los árboles filogenéticos se construyeron usando el método de “neighbor-joining” (Kimura, 1980). 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 5'NCR de los aislados del VDVB permitió clasificar a los virus en genotipos y subgrupos según la nomenclatura definida en la literatura internacional.

4. RESULTADOS

Se analizaron un total de 226 muestras de bovinos provenientes de predios ubicados en regiones del país que concentran la mayor parte de la actividad ganadera en Chile.

De las muestras de sangre obtenidas de bovinos de la Región Metropolitana, 3 presentaron títulos de anticuerpos <2 , a las cuales se les realizó 4-5 pasajes celulares en cultivos de células MDBK.

A partir de los cultivos primarios obtenidos de células de los pulmones fetales y mediante la prueba de IFD, se pudo detectar la presencia del VDVB en 9 de los 10 cultivos primarios de pulmones fetales.

También se caracterizaron genéticamente aislados virales obtenidos en el proyecto FONDECYT 1970887, las que se encontraban congeladas a -196°C en el laboratorio de Virología de nuestra Facultad. En este caso, los aislados virales se reactivaron por sucesivos pasajes en células MDBK y posterior detección por IFD.

En 45 de las 226 muestras analizadas se pudo aislar virus en cantidad suficiente para secuenciar una zona de la región 5'NCR (Cuadro 1). Es decir, 45 muestras presentaban un mínimo de 75% de la monocapa celular infectada con el VDVB y un RT-PCR positivo para la región 5'NCR.

En los 45 aislados virales seleccionados se amplificó una zona de la región 5'NCR por RT-PCR usando los partidores 324/326 (Vilcek *et al.*, 1994). Al someter una alícuota de la reacción post-PCR a electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE con posterior tinción con bromuro de etidio, en todos los aislados virales se obtuvo un fragmento de ADN de 288 pares de bases (amplicón), sin embargo la cantidad de ADN sintetizado varió entre los distintos aislados virales.

Cuadro 1. Aislados chilenos de Virus Diarrea Viral Bovino

Identificación de Aislado	Año de Aislamiento	Lugar toma de muestra	Cuadro clínico	Pasajes
113	1995	Región Metropolitana - María Pinto	PIT	11
184	1995	Región Metropolitana - María Pinto	PR	7
379	1995	Región Metropolitana	SANO	4
419	1995	Región Metropolitana - Melipilla	SANO	3
470	1995	Región Metropolitana - María Pinto	PIT	8
476	1995	Región Metropolitana	SANO	3
511	1993	Región del L.B. O'Higgins - Rancagua	ABORTO	3
649	1996	Región Metropolitana	PR	4
693	1996	Región Metropolitana - Talagante	SANO	5
809	1998	Región Metropolitana - María Pinto	DIARREA	3
914	2005	Región de la Araucanía - Pitrufquén	ABORTO	7
916	2003	Región de los Ríos - Valdivia	PIT	4
917	2003	Región de los Lagos - Llanquihue	PIT	4
918	2003	Región de los Lagos - Llanquihue	PIT	4
919	2003	Región de los Lagos - Llanquihue	PIT	4
920	2003	Región de los Lagos - Llanquihue	PIT	7
921	2003	Región de los Lagos - Los Muermos	PIT	7
927	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	4
928	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	4
939	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	4
958	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	4
971	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	4
972	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	4
992	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	4
1014	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	4
1025	2007	Región Metropolitana - Melipilla	PR	3
1061	2007	Región Metropolitana - Melipilla	PR	4
1068	2007	Región Metropolitana - Melipilla	PR	14
1071	2003	Región de la Araucanía - Cautín	DIARREA	3
1076	2007	Región de la Araucanía - Freire	SANO	4
1078	2007	Región de la Araucanía - Angol	ABORTO	4
1086	2007	Región de la Araucanía - Temuco	SANO	4
1087	2007	Región del Maule - Cauquenes	SANO	4
1091	2007	Región del Bío-Bío - Chillán	SANO	7
1092	2007	Región del Maule - Talca	ABORTO	4
1109	2007	Región del Bío-Bío - San Carlos	SANO	2
P22	2006	Región Metropolitana - Lo Valledor	FSAC	2
P23	2006	Región Metropolitana - Lo Valledor	FSAC	2
P24	2006	Región Metropolitana - Lo Valledor	FSAC	2
P26	2006	Región Metropolitana - Lo Valledor	FSAC	2
P28	2006	Región Metropolitana - Lo Valledor	FSAC	2
P30	2006	Región Metropolitana - RV Ltda.	FSAC	2
P31	2006	Región Metropolitana - RV Ltda.	FSAC	2
P32	2006	Región Metropolitana - Friosa	FSAC	2
P33	2006	Región Metropolitana - Friosa	FSAC	2

PIT: Portadores inmunotolerantes PR: Problemas Reproductivos FSAC: Feto sin antecedentes clínicos

En aquellos casos en que la concentración final de amplicón fue mayor de 10 ng/μl se pudo realizar secuenciación directa del fragmento de ADN. En aquellos aislados virales, en que la concentración del amplicón obtenido fue menor de 10 ng/μl fue necesario clonar el fragmento de ADN en el vector pGEM T-Easy, transformar bacterias *E. coli* con el plasmidio y luego de multiplicar las bacterias por 12-16 horas a 37°C, purificar el plasmidio y secuenciar el fragmento de ADN inserto en el plasmidio.

De los 45 aislados virales, 26 fueron secuenciados directamente y los 19 restantes fueron clonados en el vector pGEM-T Easy. Los virus clonados fueron: 184; 927; 928; 939; 958; 971; 972; 992; 1014; 1078; 1091; P22; P24; P26; P28; P30; P31; P32 y P33.

Los fragmentos de ADN fueron secuenciados en el Centro de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y en la empresa Genytec.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se alinearon usando el programa Clustal W 1.83 junto con 58 aislados virales nacionales e internacionales pertenecientes a los subgrupos 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k y 2a (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

Luego de alineadas las secuencias nucleotídicas, se les realizó el análisis filogenético molecular usando el programa bioinformático MEGA con el método de dos parámetros de Kimura y los árboles filogenéticos se construyeron usando el método de “neighbor-joining” con un “bootstrap” con 1000 réplicas.

El árbol filogenético obtenido se muestra en la figura 2. Este árbol nos muestra que del total de aislados virales analizados, 40 pertenecen al genotipo VDVB-1 y 5 al genotipo VDVB-2. De los virus del genotipo VDVB-1, 2 pertenecen al subgrupo VDVB1a, 15 al subgrupo VDVB1b, 20 al subgrupo VDVB1j y 3 al subgrupo VDVB1i (Cuadro 2).

Los virus del genotipo VDVB-2 se encontraron sólo en la zona central de Chile y se obtuvieron entre los años 1995 y 1998, mientras que los virus del genotipo VDVB-1 se aislaron tanto en la zona central como en la zona sur del país entre los años 1993 y 2007.

En cuanto a los porcentajes de identidad nucleotídica (PIN) entre los 45 aislados virales chilenos, se puede observar que los virus tienen un PIN intergenotipo (VDVB-1 versus VDVB-2) entre 72-79% (Tabla 1). Los virus pertenecientes al genotipo VDVB-1 presentan un PIN intragenotipo entre un 86-100% y los aislados virales del genotipo VDVB-2 tienen un PIN intragenotipo entre un 99-100%.

Los PIN dentro del subgrupo VDVB-1a van entre un 94-100%, para el VDVB-1b entre un 90-100%, para el VDVB-1j entre un 97-100% y para el subgrupo VDVB-1i entre un 98-100%. Esto indica que los virus del subgrupo VDVB-1b son los que presentan una mayor diversidad genética.

Entre los virus de los subgrupos predominantes de este estudio, es decir entre los subgrupos VDVB-1b y VDVB-1j, el PIN intersubgrupo va entre un 87-91%. Entre los subgrupos VDVB-1b y VDVB-1i van entre un 86-90% y entre los subgrupos VDVB-1j y VDVB-1i van entre un 89-91%.

Finalmente, los PIN entre los aislados del subgrupo VDVB-1a y los otros subgrupos del genotipo VDVB-1, es decir VDVB-1b, VDVB-1j y VDVB-1i, fue de 87-92%, 90-93% y 91-93% respectivamente.

Figura 2. Árbol Filogenético de los aislados chilenos del Virus Diarrea Viral Bovino

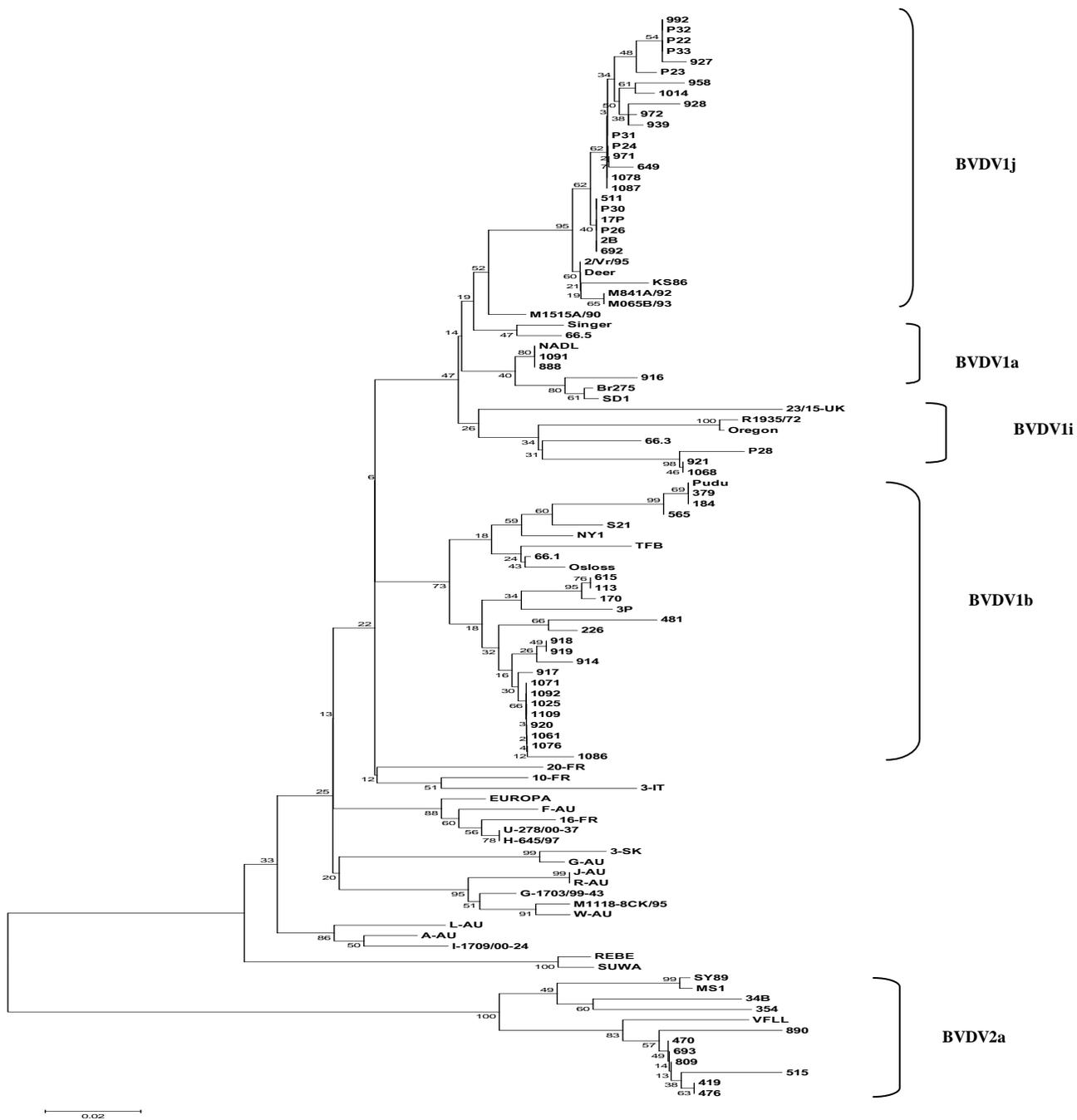


Tabla 1. Porcentajes de Identidad Nucleotídica (PIN) entre aislados virales pertenecientes a los genotipos VDVB-1 y VDVB-2

	809	470	419	476	693
113	75	75	77	77	78
184	74	74	74	74	74
379	75	75	74	74	75
511	74	74	76	76	76
649	73	73	75	75	75
914	75	75	77	77	78
916	73	73	75	75	75
917	76	76	78	78	78
918	75	75	77	77	78
919	75	75	77	77	78
920	76	76	78	78	*79
921	72	*72	73	73	74
927	73	73	73	73	74
928	73	73	74	74	75
939	74	74	76	76	76
958	73	73	74	74	75
971	74	74	76	76	76
972	74	74	75	75	76
992	74	74	74	74	74
1014	73	73	75	75	75
1025	76	76	78	78	79
1061	76	76	78	78	79
1068	72	72	73	73	74
1071	76	76	78	78	79
1076	76	76	78	78	79
1078	74	74	76	76	76
1086	76	76	78	78	78
1087	74	74	76	76	76
1091	76	75	75	74	74
1092	76	76	78	78	79
1109	76	76	78	78	79
P22	74	74	74	74	74
P23	74	74	74	74	75
P24	74	74	76	76	76
P26	74	74	76	76	76
P28	72	72	74	74	74
P30	74	74	76	76	76
P31	74	74	76	76	76
P32	74	74	74	74	74
P33	74	74	74	74	74

- Celdas muestran los PIN mínimo y máximo estimados.

Cuadro 2. Resultados de genotipos obtenidos según cuadros clínicos, año y origen.

Identificación de aislado	Año de aislamiento	Lugar toma de muestras	Cuadro clínico	Genotipo
113	1995	Región Metropolitana - María Pinto	PIT	1b
184	1995	Región Metropolitana - María Pinto	PR	1b
379	1995	Región Metropolitana	SANO	1b
419	1995	Región Metropolitana - Melipilla	SANO	2
470	1995	Región Metropolitana - María Pinto	PIT	2
476	1995	Región Metropolitana	SANO	2
511	1993	R. L. Bernardo O'Higgins - Rancagua	ABORTO	1j
649	1996	Región Metropolitana	PR	1j
693	1996	Región Metropolitana - Talagante	SANO	2
809	1998	Región Metropolitana - María Pinto	DIARREA	2
914	2005	Región de la Araucanía - Pitrufquén	ABORTO	1b
916	2003	Región de los Ríos - Valdivia	PIT	1a
917	2003	Región de los Lagos- Llanquihue	PIT	1b
918	2003	Región de los Lagos- Llanquihue	PIT	1b
919	2003	Región de los Lagos- Llanquihue	PIT	1b
920	2003	Región de los Lagos- Llanquihue	PIT	1b
921	2003	Región de los Lagos - Los Muermos	PIT	1i
927	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	1j
928	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	1j
939	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	1j
958	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	1j
971	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	1j
972	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	1j
992	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	1j
1014	2006	Región del Bío-Bío - Ñuble	PR	1j
1025	2007	Región Metropolitana - Melipilla	PR	1b
1061	2007	Región Metropolitana - Melipilla	PR	1b
1068	2007	Región Metropolitana - Melipilla	PR	1i
1071	2003	Región de la Araucanía - Cautín	DIARREA	1b
1076	2007	Región de la Araucanía - Freire	SANO	1b
1078	2007	Región de la Araucanía - Algol	ABORTO	1j
1086	2007	Región de la Araucanía - Temuco	SANO	1b
1087	2007	Región del Maule - Cauquenes	SANO	1j
1091	2007	Región del Bío- Bío - Chillán	SANO	1a
1092	2007	Región del Maule - Talca	ABORTO	1b
1109	2007	Región del Bío-Bío - San Carlos	SANO	1b
P22	2006	Región Metropolitana - Lo Valledor	FSAC	1j
P23	2006	Región Metropolitana - Lo Valledor	FSAC	1j
P24	2006	Región Metropolitana - Lo Valledor	FSAC	1j
P26	2006	Región Metropolitana - Lo Valledor	FSAC	1j
P28	2006	Región Metropolitana - Lo Valledor	FSAC	1i
P30	2006	Región Metropolitana - RV Ltda.	FSAC	1j
P31	2006	Región Metropolitana - RV Ltda..	FSAC	1j
P32	2006	Región Metropolitana - Friosa	FSAC	1j
P33	2006	Región Metropolitana - Friosa	FSAC	1j

PIT: Portadores inmunotolerantes. PR: Problemas Reproductivos. FSAC: Feto sin antecedentes clínicos

5. DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos se puede observar que la mayoría de los virus aislados pertenecen al genotipo VDVB-1 y sólo una pequeña proporción de ellos pertenece al genotipo VDVB-2.

Al comparar estos resultados con estudios previos realizados en el país (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006), notamos una gran diferencia en la composición genética de los virus aislados. 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 correspondían al genotipo VDVB-2 (51,5%). Sin embargo, los resultados de este estudio indican que sólo un 11,1% de los virus corresponden al genotipo VDVB-2.

Además, los 5 virus pertenecientes al genotipo VDVB-2 fueron aislados entre los años 1995-1998, tanto de individuos sanos como de animales con cuadro digestivo, manteniéndose almacenados en el laboratorio de Virología desde esa fecha. Es decir, ninguna de las muestras obtenidas en los últimos 8 años permitieron el aislamiento de virus pertenecientes al genotipo VDVB-2, lo que sugeriría actualmente, una ausencia o baja presencia del virus en el ganado bovino nacional.

Por otro lado, los valores de PIN obtenidos indican que los virus pertenecientes al genotipo VDVB-1 son genéticamente más heterogéneos que los virus pertenecientes al genotipo VDVB-2 (PIN intragenotipos de 86-100% y 99-100%, respectivamente). Esto concuerda 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 en el ganado bovino, que los virus del

genotipo VDVB-2 (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Becher *et al.*, 1999; Vilcek *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2005).

Los subgrupos predominantes del VDVB-1 son los subgrupos 1b (15 aislados) y 1j (20 aislados), con los subgrupos 1i y 1a agrupando a un número menor de aislados (3 y 2, respectivamente). Según estudios anteriores (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006), de 9 aislados del genotipo VDVB-1 analizados, 6 eran del subgrupo 1b, 2 del subgrupo 1j (1c, según nomenclatura de la época) y 1 del subgrupo 1a.

Otra de las diferencias encontradas con respecto al estudio anterior, es que en 2006, los virus del subgrupo 1j se encontraban en menor proporción (2/9) entre los virus analizados del genotipo VDVB-1, que lo reportado en este estudio (20/40). Esto podría explicarse por el menor número de virus analizados anteriormente, o porque en este estudio la mayoría de las muestras se obtuvo desde animales que cursaban principalmente con cuadros clínicos o problemas a nivel de sistema reproductivo, en cambio en el estudio anterior, la mayoría de los aislados virales se obtuvo desde animales sanos (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006). De hecho, la mayoría de los virus del subgrupo VDVB-1j se aisló desde animales que cursaban cuadros reproductivos. Así, de 17 animales con problemas reproductivos en los cuales se pudo aislar el VDVB, once de ellos estaban infectados con virus del subgrupo VDVB-1j, cinco con virus del subgrupo VDVB-1b y uno con virus del subgrupo VDVB-1i. Los virus del subgrupo VDVB-1b no presentan una clara asociación con un cuadro clínico específico.

Por otra parte, en este estudio se detecta por primera vez en Chile virus pertenecientes al subgrupo 1i (3 aislados). Los virus pertenecientes a este subgrupo se detectaron originalmente en Gran Bretaña (cepa 23/15 UK) (Vilcek *et al.*, 2001), pero posteriormente se han descrito en otras regiones del mundo, como la cepa Oregon (USA), 66.3 (Argentina) y R1935/72 (Brasil) (Vilcek *et al.*, 2001; Pizarro-

Lucero *et al.*, 2006). Este subgrupo viral se encuentra presente en Norte y Sudamérica, aunque aún es poco prevalente en los bovinos (Vilcek *et al.*, 2001).

Al analizar la diversidad genética de los virus presentes en los bovinos de Norteamérica y Europa, vemos que en el caso de Estados Unidos existe una alta prevalencia de virus del genotipo VDVB-2, cercana al 50% de los virus aislados (Ridpath, 2005). En cuanto a los virus pertenecientes al genotipo VDVB-1, los más comúnmente aislados tanto en Estados Unidos como en Canadá son los virus pertenecientes a los subgrupos 1a y 1b (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath, 2005), siendo prevalente VDVB-1b en el primer país mencionado (Ridpath, 2005; Tajima y Dubovi, 2005; Tajima, 2006).

En Europa, la variabilidad genética en el genotipo VDVB-1 es mayor, no encontrándose el genotipo VDVB-2 o bien, con bajas prevalencias (Wolfmeyer *et al.*, 1997; Vilcek *et al.*, 1999; Vilcek *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2005). Estudios muestran que por ejemplo en Austria existen ocho subgrupos del genotipo 1 (a, b, d, e, f, g, h y k con predominio del f) (Vilcek *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2003; Kolesarova *et al.*, 2004; Hornberg *et al.*, 2008), en España, tres (b, c, h con predominio de b) (Arias *et al.*, 2003); en Alemania, seis (a, b, c, d, f, g con predominio de b y d); (Tajima *et al.*, 2001; Tajima, 2006); en Italia ocho (a, b, d, e, f, g, h y j con predominio de b, e y d) (Falcone *et al.*, 2003; Ciulli *et al.*, 2008; Giammarioli *et al.*, 2008) y en Reino Unido, tres (a, b, i con predominio de a) (Vilcek *et al.*, 1999; Ridpath, 2005).

Si analizamos la variabilidad genética de los virus descritos en Sudamérica, podemos observar que en Argentina se ha descrito la presencia de virus de ambos genotipos, pero con un número mucho mayor de virus pertenecientes al genotipo VDVB-1 (Jones *et al.*, 2001). Dentro del genotipo 1 se describe la presencia de virus pertenecientes a los subgrupos 1a, 1b, 1i y 1j, pero con predominancia de los virus del

subgrupo 1a y en segundo lugar del subgrupo 1b, con sólo 2 aislados del subgrupo 1j, siendo el genotipo VDVB-2 considerado emergente (Jones *et al.*, 2001).

Con respecto a la situación de Brasil, en este país también se ha reportado la presencia de virus pertenecientes a ambos genotipos, con predominancia de los virus del genotipo VDVB-1 y al igual que Argentina, con prevalencia de los subgrupos 1a y 1b (Canal *et al.*, 1998; Cortez *et al.*, 2006), pero también reportándose la presencia de virus del subgrupo VDVB-1i y 1d (Cortez *et al.*, 2006). En este caso, no se ha informado del aislamiento de virus del subgrupo 1j.

Si comparamos la realidad nacional evidenciada en este estudio, con lo reportado en la literatura internacional, podemos afirmar que el perfil genético de los virus que circulan en el ganado bovino nacional, es similar a la de los virus que circulan en Argentina, al menos en cuanto a los principales subgrupos circulantes, aunque al parecer en nuestro país, el subgrupo VDVB-1j sería más prevalente que lo reportado en Argentina. Al respecto, cabe hacer notar que la cepa chilena CH511 perteneciente al subgrupo VDVB-1j presenta un Porcentaje de Identidad Nucleotídica (PIN) del 100% con las cepas argentinas 2B y 17P, en la zona analizada de la región 5^o NCR, lo que da cuenta de una gran similitud genética entre algunas cepas virales de Chile y Argentina.

El control de este virus en la industria del bovino es de gran importancia, por la variedad de cuadros clínicos que genera el VDVB, afectando varias etapas de la producción y generando grandes pérdidas económicas (Houe, 2003). Por ello, las industrias ganaderas han adoptado una serie de medidas, enfocadas en el control y prevención, tendientes a minimizar las pérdidas económicas producidas por el VDVB.

Actualmente, la prevención de la infección viral se centra principalmente en evitar las infecciones fetales, a través de la generación de inmunidad en las hembras,

antes de la preñez, con el uso de vacunas y con la eliminación de posibles fuentes de infección en los fetos (animales Portadores Inmunotolerantes) (Sandvik, 2004).

En Chile está autorizado el uso de vacunas inactivadas del VDVB, las que en algunas zonas de la región sur del país se utilizan masivamente (Reinhardt, 1992). Uno de los problemas de usar vacunas inactivadas es que no confieren una protección absoluta, permitiendo la diseminación del VDVB (Sandvik, 2004). Sin embargo, más importante aún en la generación de una adecuada estrategia vacunal, es el uso de cepas vacunales que confieran una protección adecuada contra las variantes antigénicas prevalentes en la región a aplicar la vacuna.

De los resultados de esta memoria se puede concluir que un porcentaje importante de los virus que circulan en el ganado bovino nacional, pertenecen al subgrupo VDVB-1j, tal vez responsables de generar importantes problemas reproductivos en los animales. Sin embargo, estudios de variabilidad antigénica, demuestran que los virus de este subgrupo presentan importantes diferencias antigénicas con los virus que habitualmente se emplean como cepas vacunales (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006; Nagai *et al.*, 2008), vacunas que no estarían generando una inmunidad protectora adecuada en los animales vacunados contra los virus de este subgrupo.

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 de los principales 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.

6. CONCLUSIONES

- En los 45 virus analizados filogenéticamente en la región 5'NCR del genoma viral, obtenidos desde animales asintomáticos y con distintos cuadros clínicos entre los años 1993-2007, 40 pertenecen al genotipo VDVB-1 y 5 al genotipo VDVB-2.
- Entre los virus del genotipo VDVB-1, se pudo establecer la presencia en Chile de virus pertenecientes a los subgrupos VDVB-1a (2), subgrupo VDVB-1b (15), subgrupo VDVB-1j (20) y al subgrupo VDVB-1i (3).
- Esta memoria da cuenta del aislamiento por primera vez en Chile, de virus del subgrupo VDVB-1i.
- Los resultados indican un cambio en la composición genética del VDVB en Chile, entre los virus aislados entre los años 2003-2007, con respecto a los virus aislados entre los años 1993-2001 (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006). Entre 1993-2001, cerca del 50% de los aislados resultaron ser del genotipo VDVB-2 y entre 2003-2007 no se pudo aislar virus pertenecientes al genotipo VDVB-2.
- La composición genética del VDVB en Chile es muy similar a la reportada en Argentina. Sin embargo, en nuestro caso se observa una mayor presencia de virus del subgrupo VDVB-1j, situación no descrita en otros países.

BIBLIOGRAFÍA

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

BAIGENT, S. J.; ZHANG, G.; FRAY, M. D.; FLICK-SMITH, H.; GOODBOURN, S.; MCCAULEY, J. W. 2002. Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. *J. Virol.* 76: 8979-8988.

BAKER, J. C. 1987. Bovine viral diarrhea virus. A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1990: 1449-1458.

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 diarrhea virus type I. *J. Clin. Microbiol.* 39: 146-153.

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

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

BECHER, P.; THIEL, H.J. 2002. Genus Pestivirus (Flaviviridae). In: C.A. Tidona and G. Darai, Editors, *The Springer Index of Viruses*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany 327–331.

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

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

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

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. 1995. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.* 56: 755-759.

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

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.

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.

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

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

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

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: 1893

CHASTON, T.B.; LIDBURY, B.A., 2001. Genetic budget of viruses and the cost to the infected host: a theory on relationship between the genetic capacity of viruses, immune evasion, persistence and disease. *Immunol. Cell. Biol.* 79: 62-66.

CIULLI, S., GALLETI, E.; BATTILANI, M.; SCAGLIARINI, A.; GENTILE, A.; MORGANTI, L.; PROSPERI, S. 2008. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: evidence of an increasing number of variants in Italy. *New Microbiol.* 31: 263-271.

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 :590-596.

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

COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; COLLARD, A.; QUENON, P.; DEHAN, P.; HAMERS, C.; PASTORET, P.; KERKHOFS, P. 2002. Genetic and antigenic

variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res.* 85: 17-28.

DOMINGO, E.; BARANOWSKI, E.; RUIZ-JARABO, C.M.; MARTIN-HERNANDEZ, A.M.; SAIZ, J.C.; ESCARMIS, C. 1998. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 521-527.

DONE, J.; TERLECKI, S.; RICHARDSON, C. 1980. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet. Rec.* 106: 473-479

DONIS, R.O.; DUBOVI, E.J. 1987. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. *Virology.* 158: 168-173.

DUBOVI, E. J. 1994. Impact of bovine viral diarrhoea virus on reproductive performance in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 10: 503-514.

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: 129-139.

FALCONE, E.; CORDIOLI, P.; TARANTINO, M.; MUSCILLO, M.; LA ROSA, G.; TOLLIS, M. 2003. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus in Italy. *Vet. Res. Commun.* 27: 485–494.

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

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

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 diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Can. J. Vet. Res.* 66: 181-190.

FULTON, R.W.; RIDPATH, J.F.; CONFER, A.W.; SALIKI, J.T.; BURGE, L.J.; PAYTON, M.E. 2003. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals.* 31: 89–95.

GARRY, R.F.; DASH, S. 2003. Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology*. 15 :255-265.

GIAMMARIOLI, M.; PELLEGRINI, C.; CASCIARI, C.; ROSSI, E.; DE MIA, G.M. 2008. Genetic diversity of bovine viral diarrhea virus 1: Italian isolates clustered in at least seven subgenotypes. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008 20: 783-788.

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.

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

HEINZ, F.X.; COLLETT, M.S.; PURCELL, R.H.; GOULD, E.A.; HOWARD, C.R.; HOUGHTON, M.; MOORMANN, R.J.M.; RICE, C.M.; THIEL, H.J.; FAMILY FLAVIVIRIDAE. IN: C.M.F.M.H.V. VAN REGENMORTEL, D.H.L. BISHOP, CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER., R.B. 2000. Editors, *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, San Diego, CA. 859–878.

HORNBERG, A.; REVILLA, S.; 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.*

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

HOUE H. 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31: 137–143.

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: 1637-1652.

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. *Veterinary Microbiology* 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.* 63: 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.

KOLESAROVA, M.; FRANZ, S.; JACKOVA, A.; VILCEK, S.; MÖSTL, K.; BENETKA, V.; SCHÖPF, K.; SCHODER, G.; HOFER, J.; BAUMGARTNER, W. 2004. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus from Austrian field samples. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 91: 265–268.

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.

LACKNER, T.; MÜLLER, A.; KONIG, M.; THIEL, H. J.; TAUTZ, N. 2005. Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J. Virol.* 79: 9746-9755.

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.

LENETTE, E.H.; SCHMIDT, N.J. 1964. *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases*. 3th ed. American Public Health Association, Inc. New York. USA.

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. *A.J.V.R.* 3: 1575-1584.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. 2001. *Flaviviridae: the viruses and their replication*, p. 991-1042. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. Martin A., Roizman B., and Straus S. E. (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

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.

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: 2132-2140

MAYER, D.; HOFMANN, M. A.; TRATSCHIN, J. D. 2004. Attenuation of classical swine fever virus by deletion of the viral N(pro) gene. *Vaccine.* 22: 317-328.

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. *Veterinary Microbiology* 74: 293-308.

MOENNING, V. 1990. Pestiviruses: a review. *Vet. Microbiol.* 23: 35-54.

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, I. C.; 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 New York.

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

NETTLETON, P.F. 1990. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 9: 131-150.

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

PATON, D.J.; LOWINGS, J.P.; RAMIREZ, G.C. 1994. Stability of the gp53 gene of a bovine viral diarrhoea virus isolated at different times from a persistently infected steer. *Br. Vet. J.* 150: 603-607.

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

PIZARRO-LUCERO, J.; CELEDÓN, M.; AGUILERA, M.; CALISTO, A. 2006. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet. Microbiol.* 3281: 1-10

POOLE, T.L.; WANG, C.; POPP, R.A.; POTGIETER, L.N.; SIDDIQUI, A.; COLLETT, M.S. 1995. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206: 750-754.

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 diarrhea 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 diarrhea virus J. Clin. Microbiol. 33: 2159-2161.

REINHARDT, G. 1992. Diarrea viral bovina / Enfermedad mucosa una enfermedad viral compleja. Monografía Med. Vet. 14: 49-55.

REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S.; TADICH. 2002. Muestreo predial pequeño para predecir una infección activa por virus diarrea viral bovina (VDVB) en planteles lecheros de la Xª Región de Chile. Arch. Med. Vet. 34(1): 97-101.

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

RIDPATH, J. 2005. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. Preventive Veterinary Medicine 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: 62-69.

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: 3787-3796.

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: 7645-7654.

SANDVIK, S. 2004. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20: 151-169.

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

SPRECHER, D.; BAKER, J.; HOLLAND, R.; YAMINI, B. 1991. An outbreak of fetal and neonatal losses associated with the diagnosis of bovine viral diarrhoea virus in a dairy herd. *Theriogenology* 36: 567-606.

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

TAJIMA, M.; DUBOVI, E.J. 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.

TAJIMA, M. 2006. The prevalent genotypes of bovine viral diarrhoea virus in Japan, Germany and the United States of America. *Jpn. J. Vet. Res.* 54: 129-134.

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.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.J.; GIBSON, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.

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: 349-356.

TRATSCHIN, J. D.; MOSER, C.; RÜGGLI, N.; HOFMANN, M. A. 1998.

Classical swine fever virus leader proteinase N^{pro} is not required for viral replication in cell culture. *J. Virol.* 72: 7681-7684.

VAN OIRSCHOT, J.T.; BRUSCHKE, C.J.M.; Y VAN RIJIN, P.A. 1999.

Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 64: 169-183.

VILCEK, S.; HERRING, A.J.; HERRING, J.A.; NETTLETON, P.F.; LOWINGS, J.P.;

PATON, D.J.; 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136: 309–323.

VILCEK, S.; ALENIUS, S.; PATON, D.J.; MITTELHOLZER, C.; BELAK, S. 1999.

Genetic clustering of bovine viral diarrhoea viruses in cattle farms: identification and analysis of viruses directly from cattle sera. *Vet. J.* 158: 33-38.

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.; OBRITZHAUSER, W.; DEUTZ, A.; KÖFER, J. 2003. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria). *Vet. Microbiol.* 91: 285–291.

VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M.; GREISER-WILKE, I.; PATON, D. 2004. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet. Res.* 35: 609–615.

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 diarrhea virus infection. *Am. J. Vet. Res.* 62:1095-103.

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.; KAADEN, O.R. 1997. Genomic (50UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch. Virol.* 142: 2049–2057.

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

YESILBAG, K.; FÖRSTER, C.; BANK-WOLF, B.; YILMAZ, Z.; ALKAN, F.; OZKUL, A.; BURGU, I.; CEDILLO, S.; THIEL, H-J.; KÖNIG, 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 diarrhoea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J. Virol.* 74: 5825-5835.