



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

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA REPLICATIVA DE AISLADOS CHILENOS DEL
VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA EN CÉLULAS MDBK

CRISTIAN GONZALO SANTANA TAPIA

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

PROFESOR GUÍA: JOSÉ PIZARRO LUCERO
SANTIAGO, CHILE

2013



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

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA REPLICATIVA DE AISLADOS CHILENOS DEL
VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA EN CÉLULAS MDBK

CRISTIAN GONZALO SANTANA TAPIA

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina Preventiva Animal

NOTA FINAL: _____

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : JOSÉ PIZARRO	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO : MARÍA CELEDÓN	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO : SERGIO BUCAREY	_____	_____

SANTIAGO, CHILE

2013

AGRADECIMIENTOS

Qué difícil es tratar de plasmar en unas cuantas líneas todas las ideas que hoy cruzan mi mente y a todas las personas que fueron partícipes de este camino.

A mis padres, Juan Santana y Ruth Tapia, quienes, desde el inicio, me han dado el apoyo y la fuerza para llevar esto adelante, han sabido comprender mis errores, confiados de que todo lo vivido me servirá como experiencia para ser un hombre que dará todo de sí para ser mejor cada día, sin ellos, todo lo que hoy he logrado no habría sido posible, gracias por sus consejos, paciencia y principalmente, gracias por el amor que siempre me han brindado.

A mis hermanos, Yanina, Claudio y Roberto, los que, desde mi niñez hasta el día de hoy, han estado siempre presentes, gracias por haber ayudado a formarme como persona, por haber hecho de mi infancia una etapa muy feliz, por haberme hecho sentir lo que significa ser “el hermano chico” de la familia, gracias por ser mis hermanos.

A la Catita, mi “güeli”, gracias por haberme querido y consentido, aunque ya no estás conmigo desde hace tiempo, se que desde donde estés, me has ayudado para que todo este proceso haya terminado con éxito, gracias por haber sido simplemente tú, mi abuelita.

A mi amor, Nataly Marchant, gracias por estar a mi lado, por haber sabido darme el impulso final que necesitaba para finalizar este proyecto, por querer estar conmigo y formar una familia, gracias por amarme y ser la persona con la que quiero estar el resto de mis días.

A mi hijo, Matías Santana, por que una simple sonrisa tuya es suficiente para alegrarme y me da la fuerza para seguir adelante, ya que si eres feliz significa que mi vida y lo que soy van por al camino correcto.

A mis amigos, Jorge Beamín y José Quetalpillán, quienes desde el inicio hasta hoy, han compartido conmigo todas y cada una de las etapas importantes de la carrera, largas horas de estudio, largas horas de diversión y también de trabajo, gracias por ser todo lo que la palabra “amigo” significa, además, gracias a sus familias, ya que me han aceptado como un integrante más de ellas.

A todo el grupo humano del Laboratorio de Virología, Doctores, funcionarios y estudiantes, los que siempre me ayudaron en el desarrollo de esta investigación, compartiendo su experiencia y sabiduría, pero por sobre todo gracias por haber sido mis amigos, haciendo de esta experiencia algo que recordaré siempre con alegría.

A Elcira, gracias por haber estado siempre preocupada de mí, en lo académico pero principalmente en mi persona, gracias por tu apoyo, por escucharme y darme tu consejo cuando lo necesité, gracias por ser mi amiga.

A la tía Susy, quién fue una ayuda y una guía importante en los primeros años de carrera, pero que se convirtió en una amiga, gracias por tu alegría, apoyo, comprensión y consejo, siempre deseando lo mejor de y para mí.

A todas y cada una de las personas que de una u otra forma ha hecho posible el poder completar esta importante etapa de mi vida, simplemente ¡Gracias, Totales!

A mis padres, mi hijo y a mi amor,
las personas más importantes de mi vida.

*“Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.*

Descansar, es empezar a morir”.

Gregorio Marañón (1887-1960) Médico y
escritor español.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
1.- ENFERMEDAD	2
1.1.- Infección postnatal	3
1.1.1.- Infección subclínica.....	3
1.1.2.- Diarrea viral bovina aguda.....	3
1.1.3.- Complejo diarrea neonatal bovina.....	3
1.1.4.- Síndrome Hemorrágico (SH).....	3
1.1.5.- Inmunodepresión.....	4
1.1.6.- Enfermedades respiratorias.....	4
1.1.7.- Trastornos reproductivos.....	4
1.1.8.- Enfermedad de las Mucosas (EM).....	4
1.2.- Infección prenatal	5
1.2.1.- Animales PI.....	5
1.2.2.- Enfermedad congénita.....	5
1.2.3.- Infección posterior a los 180 días.....	5
2.-TRANSMISIÓN	5
2.1.- Horizontal	5
2.2.- Vertical	6
3.- ETIOLOGÍA	6
3.1.- Clasificación	6

3.2.- Variabilidad genómica, antigénica y biológica del Virus Diarrea	
Viral Bovina.....	8
4.- MULTIPLICACIÓN DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA.....	10
5.- VIRULENCIA DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA.....	12
6.- SITUACIÓN EN CHILE.....	13
OBJETIVOS.....	15
GENERAL.....	15
ESPECÍFICOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODO.....	16
MUESTRAS.....	16
CULTIVOS CELULARES.....	18
Subcultivos Celulares.....	18
CINÉTICA DE MULTIPLICACIÓN VIRAL DE MÚLTIPLES PASOS.....	19
MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTANTE DEL VIRUS DIARREA	
VIRAL BOVINA.....	20
Tinción de antígenos virales por IPI.....	21
INDICADORES DE EFICIENCIA REPLICATIVA VIRAL.....	22
Período de multiplicación viral (horas) (T).....	22
Producción máxima de viriones (DICT ₅₀ /ml) (P).....	23
Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período	
de multiplicación viral (DICT ₅₀ /hora) (V).....	23
Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral (M).....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24

INDICADORES DE EFICIENCIA REPLICATIVA VIRAL	28
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1: Aislados chilenos del Virus Diarrea Viral Bovina.....	17
Cuadro N° 2: Títulos virales promedios de aislados nacionales de Virus Diarrea Viral Bovina obtenidos de bovinos naturalmente infectados.....	25
Cuadro N° 3: Período de multiplicación viral de aislados de Virus Diarrea Viral Bovina	31
Cuadro N° 4: Período de multiplicación viral de aislados de Virus Diarrea Viral Bovina por subgenotipos.....	32
Cuadro N° 5: Producción máxima de virus infecciosos de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina.....	35
Cuadro N° 6: Producción máxima de virus infecciosos de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina por subgenotipos.....	36
Cuadro N° 7: Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina.....	39
Cuadro N° 8: Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina por subgenotipos.....	40
Cuadro N° 9: Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina	42
Cuadro N° 10: Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina por subgenotipos.....	43
Cuadro N° 11. Medidas estadísticas para los indicadores de eficiencia replicativa por aislado viral	47

Cuadro N° 12. Medidas estadísticas para los indicadores de eficiencia replicativa por subgenotipo	48
Cuadro N° 13. Medidas estadísticas para los indicadores P y V de eficiencia replicativa por aislado viral, excluyendo los aislados 916 y 470.....	49
Cuadro N° 14. Medidas estadísticas para los indicadores P y V de eficiencia replicativa por subgenotipo, excluyendo los aislados 916 y 470.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Organización estructural de las proteínas codificadas de los <i>Pestivirus</i>	8
Figura N° 2: Cinética de multiplicación de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina 1a.....	26
Figura N° 3: Cinética de multiplicación de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina 1b.....	26
Figura N° 4: Cinética de multiplicación de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina 1i.....	27
Figura N° 5: Cinética de multiplicación de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina 1j.....	27
Figura N° 6: Cinética de multiplicación de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina 2a.....	28
Figura N° 7: Período de multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina.....	32
Figura N° 8: Período de multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina.....	33
Figura N° 9: Producción máxima de virus infecciosos de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina.....	36
Figura N° 10: Producción máxima de virus infecciosos de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina.....	37
Figura N° 11: Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación Viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina.....	40

Figura N° 12: Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina.....	41
Figura N° 13: Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina.....	43
Figura N° 14: Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina.....	44

RESUMEN

El Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) está ampliamente distribuido a nivel mundial y afecta tanto a rumiantes domésticos (bovinos, caprinos, ovinos, etc.) como silvestres (ñu, jirafa, búfalo, etc.), siendo una de las principales causas de pérdidas económicas en el ganado bovino, debido principalmente a problemas reproductivos.

El VDVB presenta una alta variabilidad genómica, que se manifiesta en sus características biológicas y antigénicas. La manifestación clínica de la enfermedad también presenta importantes diferencias, que van desde cuadros subclínicos (la mayoría de los casos) hasta presentaciones con un 100% de mortalidad. Estas diferencias se deben a una serie de factores, tanto del virus como del hospedador, siendo uno de los factores importantes la virulencia del aislado viral, que se asocia a la eficiencia replicativa del VDVB.

El objetivo de esta Memoria de Título fue determinar la eficiencia replicativa de diez aislados del VDVB, obtenidos de bovinos naturalmente infectados con diferentes manifestaciones clínicas y pertenecientes a los distintos genotipos y subgenotipos presentes en Chile, ocho pertenecientes al genotipo 1 (VDVB1a, 1b, 1i y 1j) y dos al genotipo 2 (VDVB2a). Para ello, se determinó la cinética de multiplicación viral en cultivos de células *Madin-Darby Bovine Kidney* y la eficiencia replicativa se estimó ocupando los siguientes indicadores: Producción máxima de viriones ($\text{DICT}_{50}/\text{ml}$) (P), Período de multiplicación viral (horas) (T), Velocidad de síntesis de viriones (V), en que $V=P/T$ y la Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral (M).

De acuerdo a los indicadores, los virus de los subgenotipos 1a y 1j tendrían una alta eficiencia replicativa, principalmente por la capacidad de completar su ciclo infeccioso a 12 horas post-infección y los menores tiempos para concluir la multiplicación viral. Por otra parte, los virus del subgenotipo 1b y 1i serían los virus con la menor eficiencia replicativa, considerando su baja producción máxima de viriones, velocidad de síntesis de virus infecciosos y la pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral.

Palabras claves: *Pestivirus, Virus Diarrea Viral Bovina, virulencia, eficiencia de la multiplicación viral.*

ABSTRACT

Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) is widely distributed in the world and it affects both domestic (cattle, goats, sheep, etc) and wild (wildebeest, giraffe, buffalo, etc.) ruminants. This virus is one the main causes of economic losses in cattle, associated to reproductive problems.

The BVDV is a virus with a high genomic variability, which is reflected in its biological and antigenic characteristics. The clinical signs of the disease have significant differences also, from subclinical cases (most of them) to 100% of mortality manifestations. These differences are due to a number of factors, both from the virus and the host, being one of the most important ones the virulence of the viral isolation, connected to the efficient replication of VDVB.

The main target of this Dissertation was to establish the replicative efficiency of 10 VDVB isolates, obtained from naturally infected cattle with different clinical manifestations, belonging to the different genotypes and subgenotypes here in Chile. Eight of the ten isolates belongs to genotype 1 (VDVB1a, 1b, 1i y 1j) and two to genotype 2 (VDVB2a). For this, it was determined the kinetics of viral growth in Madin-Darby Bovine Kidney cell cultures, and also the replicative efficiency was estimated by the next indicators: Maximum productions of virions ($DICT_{50}/ml$) (P), Viral multiplication period (hours) (T), Synthesis velocity of virions (V), in which $V=P/T$ and the Slope during exponential phase of the viral multiplication (M).

According to the analysed indicators, the viruses with subgenotypes 1a and 1j, would have a high replicative efficiency, especially for the capacity to complete its infectious cycle, at 12 hours post infection and the lower times to conclude the viral multiplication. On the other hand, subgenotype 1b and 1i viruses would be the ones with the least replicative efficiency, considering their low maximum virions production, synthesis velocity of infectious viruses and the slope during exponential phase of the viral multiplication.

Keywords: *Pestivirus, Bovine Viral Diarrhoea Virus, virulence, viral replication efficiency.*

INTRODUCCIÓN

El Virus Diarrea Viral Bovina es el agente causal de una de las enfermedades infecciosas más comunes del ganado bovino, aunque también es capaz de infectar a otras especies, tales como ovinos, caprinos, porcinos, camélidos sudamericanos y rumiantes silvestres, los cuales muchas veces son un reservorio del virus.

El virus es de distribución mundial, con prevalencias serológicas que fluctúan entre un 50 y un 90%. El virus genera pérdidas económicas importantes en la industria del bovino, ya que se ven afectados tanto parámetros productivos como reproductivos, a causa de la presentación de diarrea, aborto, inmunodepresión, nacimiento de terneros débiles y con baja ganancia de peso.

El virus se transmite tanto en forma horizontal (postnatal) como vertical (prenatal), siendo la vía oronasal la principal forma de contagio horizontal. La infección vertical puede dar como resultado animales portadores inmunotolerantes (PI) los que son los principales diseminadores de la enfermedad, ya que eliminan de por vida el virus.

El virus presenta una alta variabilidad genómica, antigénica y biológica. El análisis genético ha demostrado la presencia de distintos genotipos y subgenotipos, existiendo cepas citopáticas (CP) y no citopáticas (NCP) en los cultivos celulares.

En Chile, el virus fue aislado por primera vez en el año 1985 desde terneros que sufrían de enfermedad de las mucosas. Estudios serológicos indican una prevalencia de alrededor de un 70% en bovinos de la IX Región de La Araucanía y X Región de Los Lagos, y de un 86% para bovinos de carne y de un 60% para bovinos de leche en la Región Metropolitana de Santiago.

El presente estudio tiene por objetivo determinar la eficiencia replicativa de distintos aislados chilenos del virus en células *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La Diarrea Viral Bovina (DVB), es una de las enfermedades infecciosas más comunes del ganado bovino, aunque también se ha detectado en porcinos, ovinos, caprinos, camélidos sudamericanos y rumiantes silvestres, como ciervos, búfalos, jirafas, gamos, ñus y alces (Nettleton, 1990). Es de distribución mundial, y es endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas, con prevalencias serológicas que fluctúan entre un 50 y un 90% (Baker, 1990; Goyal y Ridpath, 2005; Morán *et al.*, 2006). El primer registro de la DVB se remonta al año 1946 cuando una nueva enfermedad transmisible en el ganado fue observada en New York. Se caracterizaba por presentar leucopenia, fiebre, depresión, diarrea, anorexia, erosiones gastrointestinales y hemorragias. El agente causal fue aislado en el año 1957 y se le denominó Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) (Ridpath, 2010). Este virus es responsable de provocar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones en el animal infectado, siendo los trastornos reproductivos los de mayor impacto económico (Lértora, 2003). Además de producir problemas reproductivos, la infección por el VDVB causa disminución de la producción de leche, diarrea, problemas respiratorios, síndrome hemorrágico, aumenta la mortalidad de terneros, favorece la aparición de otras enfermedades y retarda el crecimiento (Houe, 1999; Robert, 2004). Las pérdidas productivas en el ganado bovino se han estimado entre USD 10-57 millones/millón de terneros (Houe, 2003).

1.- ENFERMEDAD

Las numerosas manifestaciones clínicas y lesiones ocasionadas por el VDVB, se dan producto de la interacción de distintos factores, tales como: cepa y biotipo viral, edad y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes (Baker, 1990; Lértora, 2003; Goyal y Ridpath, 2005). Tanto para VDVB-1, como para VDVB-2, la mayoría de las infecciones que se producen en individuos adultos inmunocompetentes da como resultado una enfermedad clínica leve o

subclínica y el aislado obtenido posee uno de los dos biotipos, siendo el biotipo NCP el más frecuente (Ridpath, 2003).

1.1.- Infección postnatal

1.1.1.- Infección subclínica

La mayoría de las infecciones son subclínicas o de carácter moderado, con alrededor de un 70% de los animales infectados, los que presentan fiebre, descarga óculo-nasal, leucopenia transitoria, elevada morbilidad y baja letalidad (Goyal y Ridpath, 2005). Se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días post-infección y la protección contra reinfecciones con cepas antigénicamente homólogas del virus es de por vida (Lértora, 2003).

1.1.2.- Diarrea viral bovina aguda

Es una infección post natal aguda, de severidad variable, en bovinos seronegativos e inmunocompetentes (Lértora, 2003). Esto, generalmente, sucede en animales cuyas edades fluctúan entre seis y 24 meses. El período de incubación es de cinco a siete días, con posterior fiebre transitoria, leucopenia, y viremia durante 15 días. (Ames, 1986; Brownlie, 1990). En el último tiempo se ha observado un aumento de infecciones agudas severas, con elevada morbilidad y mortalidad, caracterizada por fiebre elevada, signos respiratorios, diarrea, tormenta de abortos, caída en la producción de leche y muerte súbita (Goyal y Ridpath, 2005).

1.1.3.- Complejo diarrea neonatal bovina

Cuando falla la transferencia pasiva de anticuerpos, el virus participa en el complejo diarrea neonatal de los terneros. Infecciones concurrentes con enteropatógenos resultan en manifestaciones clínicas más severas, debido al efecto inmunodepresor del VDVB o simplemente a una sumatoria de efectos (Goyal y Ridpath, 2005).

1.1.4.- Síndrome Hemorrágico (SH)

Presenta una alta letalidad, independientemente de la edad, clínicamente se observa diarrea hemorrágica, fiebre, epistaxis, sangramiento de los sitios de inyección y una severa

trombocitopenia, la cual al parecer es por un efecto directo del virus sobre las plaquetas circulantes (Corapi *et al.*, 1990; Bolin y Ridpath, 1992).

1.1.5.- Inmunodepresión

El VDVB ocasiona leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, aumentando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes (Lértora, 2003). Tiene una fuerte afinidad por el tejido linforreticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos tejidos (Lértora, 2003; Goyal y Ridpath, 2005).

1.1.6.- Enfermedades respiratorias

El VDVB origina inmunodepresión sistémica y pulmonar, aumentando la patogenicidad de otros agentes respiratorios (Lértora, 2003; Goyal y Ridpath, 2005). Además, se ha demostrado que ciertos aislados del VDVB actúan como agentes primarios de neumonías (Lértora, 2003).

1.1.7.- Trastornos reproductivos

El mayor impacto económico de la infección con el VDVB es el ocasionado por los trastornos reproductivos (Lértora, 2003). La infección aguda altera la función ovárica y reduce la fertilidad. El VDVB causa ooforitis intersticial no purulenta, con necrosis de células de la granulosa y de oocitos (Goyal y Ridpath, 2005).

1.1.8.- Enfermedad de las Mucosas (EM)

Esta condición sólo ocurre en animales PI que experimentan una sobreinfección con biotipos CP antigénicamente homólogos. En esta enfermedad se aíslan ambos biotipos del virus. El biotipo CP surge de mutaciones del biotipo NCP, aunque también puede ser por una infección externa (Lértora, 2003). Es de presentación esporádica, letal, de curso agudo o crónico y se caracteriza por severa leucopenia, diarrea profusa, erosiones y ulceraciones en el sistema digestivo (Lértora, 2003; Goyal y Ridpath, 2005).

1.2.- Infección prenatal

1.2.1.- Animales PI

Cuando la infección intrauterina se produce antes de los 125 días de gestación por una cepa NCP, no se desarrollan anticuerpos séricos, la gestación puede llegar a término y el animal nace, ya sea con bajo desarrollo o normal, pero con una infección persistente y con anticuerpos maternos. Estos animales son virémicos durante toda su vida y no producen anticuerpos contra la cepa que les originó la inmunotolerancia. La infección persistente debe ser considerada en todo ternero pequeño al nacimiento, con escaso desarrollo, baja ganancia de peso y con cuadros recurrentes de enfermedad respiratoria y digestiva. Otros son clínicamente normales, siendo indispensable el diagnóstico de laboratorio para determinar si son animales PI (Goyal y Ridpath, 2005).

1.2.2.- Enfermedad congénita

Cuando la infección intrauterina se da entre los 125 a 180 días de gestación, el virus puede provocar hipoplasia cerebelar, atrofia de retina, hidrocefalia, neuritis óptica y cataratas. La aplicación de vacunas vivas modificadas en hembras gestantes entre los 90 a 118 días puede ser una causa de enfermedades congénitas en los animales nacidos de las hembras vacunadas (Goyal y Ridpath, 2005).

1.2.3.- Infección posterior a los 180 días

La capacidad inmunológica está totalmente establecida en el feto y por lo tanto el animal es capaz de generar anticuerpos contra el virus protegiéndolo de la infección (Goyal y Ridpath, 2005).

2.- TRANSMISIÓN

2.1.- Horizontal

En la transmisión horizontal (infección postnatal), el virus infecta a un animal a través de la inhalación o ingestión de productos contaminados con saliva, secreciones óculo-nasales o uterinas, leche, semen, heces, orina y sangre procedentes de animales

infectados. También, los animales se pueden infectar con la administración parenteral de productos biológicos contaminados con el virus, principalmente vacunas, picaduras de insectos hematófagos, empleo de agujas hipodérmicas contaminadas, palpación rectal, inseminación e implantación de embriones procedentes de animales infectados (Baker, 1990; Goyal y Ridpath, 2005).

2.2.- Vertical

En la transmisión vertical (infección prenatal), el virus se transmite desde la madre gestante al feto. La patología causada al embrión por el virus dependerá fundamentalmente del tiempo de gestación del feto al momento de la infección y del aislado viral (Goyal y Ridpath, 2005). Si el feto es infectado por biotipos NCP antes de adquirir competencia inmunológica (antes del día 125 de gestación, aproximadamente) podrá nacer como animal PI. Pese a la elevada tasa de mortalidad de los animales PI en su primer año de vida (más del 50%), muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen. Hembras PI siempre gestarán terneros PI. La transmisión vertical también ocurre luego de la transferencia embrionaria si el recipiente es PI, o la vaca donante es PI y no se realiza el correcto lavado del embrión (Lértora, 2003).

3.- ETIOLOGÍA

3.1.- Clasificación

El VDVB pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* junto al virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC), que afecta principalmente a porcinos, y el virus de la Enfermedad de la Frontera (VEF), que afecta principalmente a ovinos y caprinos (Murphy *et al.*, 1995; Lértora, 2003). Estos virus presentan similitudes estructurales y antigénicas entre ellos, que se traducen en reacciones antigénicas cruzadas y pueden producir infecciones interespecies (Becher *et al.*, 1999). La partícula viral es relativamente pequeña, con un diámetro de 30-40 nm, con envoltura lipídica y un genoma constituido por una hebra simple de RNA, de polaridad positiva, de un tamaño de 12,3 Kb (Boulangier *et al.*, 1992; Lértora, 2003; Lindenbach *et al.*, 2007). El genoma presenta en su extremo 5' una

región no codificante (5'UTR, del inglés “*Untranslated Region*”) constituida por 360-390 bases, luego posee una región codificante única de aproximadamente 11.000 bases y finalmente, en su extremo 3' presenta una región no codificante (3'UTR) de unas 200 bases (Murphy *et al.*, 1995; Lindenbach *et al.*, 2007). El genoma viral no presenta estructura cap en su extremo 5', ni tampoco el tracto poli(A) en el extremo 3' (Ridpath, 2010).

La poliproteína viral es procesada co- y post-traduccionalmente por proteasas celulares y virales generando 11-12 proteínas maduras (Lackner *et al.*, 2005; Lindenbach *et al.*, 2007). El orden de las proteínas virales individuales dentro de la poliproteína es el siguiente: Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-3(NS2-NS3)-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B (Figura N° 1) (Ridpath, 2010).

La primera proteína codificada por el virus es Npro (Meyers y Thiel, 1996). Es una proteasa que se escinde a si misma de la poliproteína viral. Esta proteína también tiene funciones en la supresión del sistema inmune innato del hospedador, a través del bloqueo de la actividad del factor regulador del interferón 3 (IRF3), que inhibe la producción del interferón tipo I (Ridpath, 2010).

Luego, se sintetizan las proteínas estructurales, que corresponden a 1/3 de la poliproteína. La primera proteína estructural es la proteína C, que forma la nucleocápside viral. Luego se sintetizan las glicoproteínas virales Erns, E1 y E2 que se ubican en la envoltura lipídica del virus (Meyers y Thiel, 1996). La proteína Erns, que posee actividad RNasa, además de encontrarse en la partícula viral, es secretada al exterior de la célula infectada. Se postula que la proteína previene la inducción del interferón β mediante la unión y degradación del RNA de hebra doble (Ridpath, 2010). E2 es la proteína más abundante de la partícula viral y juega un rol preponderante en la respuesta inmune del hospedero, ya que posee los epítopes críticos en la estimulación de la producción de anticuerpos neutralizantes (Boulangier *et al.*, 1992). Los 2/3 restantes de la poliproteína corresponden a las proteínas no estructurales, las que se encuentran formadas por p7, NS2/3 (NS2, NS3) NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (Meyers y Thiel, 1996). Para p7 no se conoce función, NS2/3 posee actividad RNA helicasa y serina proteasa, NS4A actúa como

cofactor de la serina proteasa, NS4B y NS5A son componentes de la replicasa y NS5B es la polimerasa RNA-dependiente viral (Ridpath, 2010).

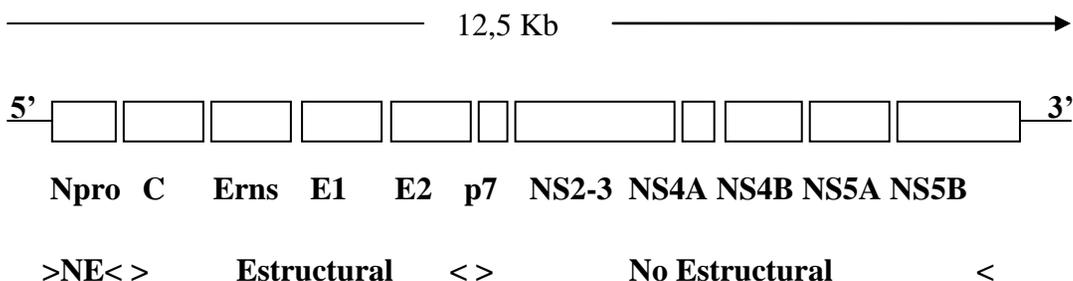


Figura N° 1: Organización estructural de las proteínas codificadas de los *Pestivirus* (esquema adaptado de Peterhans *et al.*, 2010).

3.2.- Variabilidad genómica, antigénica y biológica del Virus Diarrea Viral Bovina

El VDVB, al igual que los otros pestivirus, presenta una gran variabilidad genómica, expresada por una alta frecuencia de mutaciones puntuales y evidencias de recombinaciones genómicas en NS2-3 (Meyers y Thiel, 1996). Esto es característico de un virus RNA, debido a que poseen una polimerasa sin la función exonucleasa necesaria para corregir las bases mal incorporadas durante el proceso de replicación del genoma viral. Esto genera una alta frecuencia de mutaciones, de aproximadamente una mutación por cada 10.000 bases (Lértora, 2003). Análisis de las secuencias nucleotídicas del genoma del VDVB indican que la región más conservada de éste es la región 5'UTR, y la más variable es la del gen que codifica para la glicoproteína E2 (Paton *et al.*, 1995; Vilcek *et al.*, 2005).

El análisis de la secuencia nucleotídica del extremo 5'UTR, indica que existe una gran variabilidad entre distintos aislados del VDVB, encontrándose diferencias entre un 25% a un 40% (Pellerin *et al.*, 1994), lo que ha permitido clasificar a estos aislados virales en dos genotipos (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994).

El genotipo 1, denominado VDVB-1, agrupa a las principales cepas de laboratorio (NADL, Singer, C24V, etc.) y a aquellos aislados que provocan cuadros clínicos leves; el genotipo 2, denominado VDVB-2, agrupa además de aislados asociados a cuadros clínicos

leves, a las cepas más virulentas, responsables del SH o DVB aguda severa, siendo ésta una variante emergente de VDVB, que se ha vuelto común, sobretodo en Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Japón, Argentina y Brasil, pero que ha sido raramente descrita en Europa (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). El análisis filogenético del genoma viral ha permitido segregar a los aislados del VDVB, en al menos 16 subgenotipos dentro del genotipo 1, desde el VDVB-1a hasta el VDVB-1p (Ridpath, 2010; Peterhans *et al.*, 2010). Las cepas So CP/75 y TR8/TR16, que también fueron etiquetadas como VDVB-11, fueron renombradas, posteriormente, como VDVB-1n y VDVB-1p, respectivamente (Peterhans *et al.*, 2010). Dentro del genotipo 2 se han descrito dos subgenotipos, VDVB-2a y VDVB-2b (Ridpath, 2010).

La variabilidad genómica también se expresa en el comportamiento biológico y antigénico del virus, lo que explicaría las distintas patologías causadas por el virus (Bolin y Ridpath, 1992).

Con respecto a las características biológicas del VDVB, este presenta dos biotipos en la naturaleza: CP y NCP, determinado por la capacidad del virus de provocar efecto citopático y muerte celular en cultivos celulares (Meyers y Thiel, 1996; Bolin y Grooms, 2004). El virus CP provoca vacuolización del citoplasma y muerte celular a pocos días de la infección, en cambio el virus NCP, el más prevalente en la naturaleza y virus parental del virus CP, no provoca daño celular visible en los cultivos infectados (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). En el biotipo 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 (Meyers y Thiel, 1996). La mayoría de los aislados obtenidos en campo corresponden a cepas del biotipo NCP (Thabti *et al.*, 2002; Saliki y Dubovi, 2004). Se ha demostrado que las cepas NCP pueden infectar una gran cantidad de tejidos (epitelio del tracto digestivo y respiratorio, tejido linfoide, órganos reproductivos, etc.), mientras que las cepas CP

principalmente infectan tejido linfoide del sistema digestivo. Además, los animales infectados por cepas NCP generan una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes que aquellos animales infectados por cepas CP (Lambot *et al.*, 1998).

Respecto de las características antigénicas del virus, este posee un solo serotipo, sin embargo, mediante la realización de ensayos de seroneutralización viral usando anticuerpos monoclonales y policlonales, se ha podido establecer que existen diferencias antigénicas importantes entre distintos aislados del VDVB, encontrándose las mayores diferencias entre aislados del VDVB-1 y VDVB-2 (Corapi *et al.*, 1990; Xue *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994).

4.- MULTIPLICACIÓN DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA

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

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

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

Las proteínas virales no estructurales se ensamblan en un complejo funcional de replicación y sirven, en parte, para catalizar la síntesis de una hebra de RNA complementaria de sentido negativo. El RNA de sentido negativo provee plantillas para sintetizar nuevas moléculas de RNA sentido positivo, usando un modelo de replicación asimétrico semiconservativo. El modelo incluye tres tipos de RNA virales, una forma replicativa de dos hebras, una hebra parcialmente simple y parcialmente doble y un RNA viral de una hebra. El cambio de la función del RNA, de un ciclo de traducción a replicación, se debe a la participación de estructuras y funciones de la región 5’UTR, incluyendo sitios del IRES; a la acumulación de proteínas virales, como NS5A y NS5B que pueden inhibir la traducción dependiente de IRES; a la participación de proteínas regulatorias que interactúan con el genoma viral fuera de las IRES; a la interacción entre los complejos proteicos de traducción del virus y de la célula y a la competencia por la replicasa y el ribosoma (Yu *et al.*, 2000; Li y McNally, 2001; Ridpath, 2010).

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

exocitosis, con la detección de virus extracelular tan temprano como ocho horas post infección (hpi) (Nuttall, 1980; Ridpath, 2010).

En modelos de cultivo celular, la replicación de VDVB ha sido detectada dentro de cuatro a seis hpi, con títulos máximos entre las 12 a 24 hpi (Purchio *et al.*, 1983; Gong *et al.*, 1996).

5.- VIRULENCIA DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA

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

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

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

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

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

6.- SITUACIÓN EN CHILE

Entre los años 1983 y 1984 se sospecha la presencia de la DVB/EM en Chile, basado en hallazgos anatomopatológicos típicos de DVB en bovinos enfermos en la X Región de Los Lagos (Fiedler *et al.*, 1986). El virus se aisló por primera vez en Chile en el año 1985 a partir de un brote de EM en terneros de la X región de Los Lagos (Reinhardt, 1992), aislándose posteriormente en numerosas ocasiones desde bovinos sanos y enfermos, así como de fetos abortados (Celedón *et al.*, 1997a) y de vacas PI (Celedón *et al.*, 1998). El virus se encuentra ampliamente diseminado en el país, con prevalencias serológicas de un 69,2% en la IX Región de La Araucanía y X Región de Los Lagos (Reinhardt, 1990) y un 59,7% en bovinos de leche (Celedón *et al.*, 1996) y un 86% en bovinos de carne de la Región Metropolitana de Santiago (Celedón *et al.*, 1997b). Además, el virus se ha aislado de ovejas, cabras (Müller, 2003), alpacas y llamas (Celedón *et al.*, 2006).

A nivel nacional se ha podido determinar, mediante análisis genómico de aislados nacionales del VDVB, la presencia de ambos genotipos, VDVB-1 y VDVB-2, y de los subgenotipos 1a, 1b, 1i y 1j (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006; Donoso, 2009). Por otra parte, el

análisis por seroneutralización cruzada de cuatro aislados nacionales pertenecientes a los subgenotipos VDVB-1b, VDVB-1j y VDVB-2, permitió determinar que existe una baja antigenicidad cruzada entre ellos, así como también con la cepa NADL, un virus perteneciente al subgenotipo VDVB-1a, comúnmente usada en la elaboración de vacunas (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006). Todos los virus aislados en Chile han resultado ser del biotipo NCP y, si bien presentan el mismo tropismo celular, presentan diferencias importantes entre sí, en la eficiencia y diseminación de la infección, duración del ciclo infectivo viral y número de ciclos infectivos a 30 hpi de cultivos celulares (Montt, 2004).

Considerando los antecedentes presentados, que dan cuenta de diferencias genómicas, antigénicas y de actividad biológica importantes entre distintos aislados del VDVB y la amplia variedad de presentaciones clínicas de la enfermedad en forma natural, desde cuadros subclínicos hasta infecciones de curso mortal, como el SH o la EM, en esta memoria de título se estudia la eficiencia replicativa de aislados nacionales del VDVB, en curvas de multiplicación viral de varios pasos, como probable predictor de virulencia del VDVB.

OBJETIVOS

General

- Conocer la eficiencia replicativa de aislados nacionales de distintos subgenotipos del VDVB durante su multiplicación en células MDBK.

Específicos

- 1) Determinar la cinética de replicación en células MDBK de aislados virales de los genotipos y subgenotipos del VDVB presentes en Chile.

- 2) Determinar la eficiencia replicativa en células MDBK de aislados virales de los genotipos y subgenotipos del VDVB presentes en Chile.

MATERIALES Y MÉTODO

MUESTRAS

En esta Memoria de Título se estudiaron diez aislados chilenos del VDVB, pertenecientes a distintos genotipos y subgenotipos, obtenidos desde bovinos infectados naturalmente en campo, en la zona central y sur del país, tanto de animales sanos como de animales con cuadros clínicos asociados a la infección con el VDVB (diarrea, aborto, problemas reproductivos) (Cuadro N° 1). Los virus se encontraban en las dependencias del Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, conservadas a -80°C. Los diez aislados virales pertenecen a los dos genotipos (VDVB-1 y VDVB-2) y a los cinco subgenotipos presentes en el país (VDVB 1a, VDVB 1b, VDVB 1i, VDVB 1j, VDVB 2a).

Cuadro N° 1: Aislados Chilenos del Virus Diarrea Viral Bovina

Número del aislado	Año de aislamiento	Origen del virus	Cuadro clínico	Tipo de muestra	Subgenotipo
916	2003	Región de Los Ríos-Valdivia	*PI	Sangre	1a
1091	2007	Región del Bío Bío-Chillán	Sano	Sangre	1a
113	1995	Región Metropolitana-María Pinto	PI	Sangre	1b
1025	2007	Región Metropolitana-Melipilla	**PR	Sangre	1b
921	2003	Región de Los Lagos-Los Muermos	PI	Sangre	1i
1068	2007	Región Metropolitana-Melipilla	PR	Sangre	1i
511	1993	Región del L.B. O'Higgins-Rancagua	Aborto	Órganos	1j
1087	2007	Región del Maule-Cauquenes	Sano	Sangre	1j
470	1995	Región Metropolitana-María Pinto	PI	Sangre	2a
809	1998	Región Metropolitana-María Pinto	Diarrea	Órganos	2a

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

CULTIVOS CELULARES

En los estudios de multiplicación viral se utilizó la línea celular MDBK, libre de infección por el VDVB. Las células se mantuvieron mediante subcultivos realizados cada cuatro a cinco días aproximadamente, realizados según procedimiento estándar (Edwards, 1990) en botellas de vidrio de 100 ml de capacidad.

Las células se llevaron a una concentración de 100.000 células/ml en un total de 10 ml de medio de cultivo MEM: Medio Esencial Mínimo, Cat. N° 41500-067 (GIBCO[®], BRL). Para cuatro litros de medio de cultivo MEM se adicionan 3.900 ml de agua destilada, desionizada y estéril (H₂O_{DDE}), 40 ml de piruvato de sodio 100 mM, Cat. N° 11360 (GIBCO[®], BRL), 8,8 gr de bicarbonato de sodio (MERCK), 23,8 gr de “buffer” HEPES, CAT. N° 11344-041 (GIBCO[®], BLR), 10 ml de fungizona, Cat. N° 15290-018 (GIBCO[®]), 16 ml de combiótico (penicilina 5x1.000.000 UI y estreptomycin 5 gr en 100 ml de H₂O_{DDE}). El medio de cultivo para crecimiento celular se suplementó con 5% de suero equino proveniente del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en ambiente húmedo con 5% de CO₂ en una cámara de incubación HERA cell 150 (Thermo, ELECTRON CORPORATION) ubicada en las dependencias del Laboratorio de Virología.

Subcultivos celulares

A las células incubadas por 24 horas en las botellas, se les retiró el medio de cultivo MEM, se lavaron con 10 ml de solución salina A de Puck (Puck *et al.*, 1961) a 37°C por un tiempo de 10 a 15 minutos y se eliminó la solución salina. Luego, las células se adicionaron de cuatro ml de solución tripsina-verseno (Tripsina 0,05% Verseno 0,02% en solución salina A de Puck), también a 37°C, se eliminaron 2 ml de esta solución y se incubó en estufa a 37°C por 10 minutos con el fin de desprender la monocapa celular de la botella. Posteriormente, se agregaron 5 ml de medio de cultivo MEM y se determinó la concentración celular en una cámara de Neubauer (BOECO, Germany) utilizando un microscopio óptico Nikon[®], modelo Eclipse TS-100, con aumento de 100x y 400x. Luego de ajustar la concentración celular a 100.000 células/ml, se procedió a sembrar,

nuevamente, en botellas de vidrio con 10 ml de medio de cultivo MEM suplementado con 5% de suero equino. Las células sembradas se incubaron a 37°C en ambiente húmedo con 5% de CO₂ y por cuatro a cinco días aproximadamente, momento en que se hizo el siguiente subcultivo.

CINÉTICA DE MULTIPLICACIÓN VIRAL DE MÚLTIPLES PASOS

Previo a infectar las monocapas de células MDBK, los aislados virales, cuyo título viral inicial fluctuaba entre 10^{5,5} y 10⁷ dosis infectante cultivo de tejido 50% (DICT₅₀)/ml, se diluyeron en medio de cultivo MEM con el propósito de inocular cada pocillo con una dosis infectante de 0,05 DICT₅₀/célula o 10.000 DICT₅₀ virus / 200.000 células por pocillo.

A monocapas de células MDBK, 80% confluentes, previamente sembradas en microplacas de 24 pocillos (NUNC[®]) a una concentración de 200.000 células/ml, se les retiró el medio de cultivo MEM, se lavaron con 200 µl de solución salina A de Puck y, luego de retirar la solución salina, se infectaron con 0,5 ml (10.000 DICT₅₀/500 µl) del inóculo viral. Luego de adsorber el virus por una hora en cámara de incubación a 37°C, en ambiente húmedo y 5% de CO₂, se retiró el inóculo, se lavó con 0,5 ml de medio de cultivo MEM sin suero equino y se agregó 0,5 ml de medio de cultivo MEM suplementado con 2,5% de suero equino. Las células se incubaron a 37°C en ambiente húmedo con 5% de CO₂.

Posteriormente, a intervalos de 12 hpi de incubación (12-24-36-48-60-72-84-96 hpi), se procedió a retirar el medio de cultivo de las células infectadas, el que se guardó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron con 200 µl de medio de cultivo MEM sin suero equino, el que luego de ser retirado se juntó con el medio de cultivo guardado en el tubo de microcentrífuga. Luego, se agregó a las células 500 µl de tripsina- verseno (calentada a 37°C), se incubaron por 20 minutos a 37°C en ambiente húmedo para desprender las células del pocillo y las células desprendidas se colocaron en un tubo de microcentrífuga, el que se centrifugó (Biofuge primo cell, Heraeus[®]) a 2.000xg por 20 minutos a 4°C, para eliminar la tripsina- verseno. El sedimento de células se resuspendió con el medio de cultivo MEM previamente guardado y se

conservó a -20°C . Luego, las células y el medio de cultivo se sometieron a dos ciclos más de congelamiento/descongelamiento con el propósito de producir la lisis celular y la consecuente liberación del virus y se almacenó a -20°C hasta medir la capacidad infectante de cada lisado celular.

MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTANTE DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA

Para conocer la cantidad de virus infeccioso en los lisados celulares se realizó la titulación viral por el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938), que permite identificar la dilución de virus que tiene la capacidad de infectar el 50% de la monocapa celular y corresponde a una DICT_{50} . El valor recíproco de dicha dilución representa el valor de DICT_{50} que contiene el correspondiente lisado celular. Para ello, se realizaron diluciones en base 10 (10^{-1} a 10^{-6}) de los lisados celulares obtenidos a distintos tiempos de incubación (12 a 96 hpi) mantenidos a -20°C . A monocapas de células de la línea MDBK, previamente cultivadas por 24 horas en microplacas de 96 pocillos (NUNC[®]), se les retiró el medio de cultivo MEM y se infectaron con cada dilución viral en medio de cultivo MEM suplementado con 2,5% de suero equino. Luego de incubar por 72 horas a 37°C en ambiente húmedo con 5% de CO_2 , se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron con 100 μl de “buffer” PBS pH 7,6. Luego, las células se lavaron con 100 μl de acetona al 20% en PBS 1x pH 7,6 y se fijaron con 200 μl de acetona al 20% en “buffer” PBS pH 7,6 por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó la acetona y las células se secaron bajo una lámpara durante cuatro horas o a temperatura ambiente durante 24 horas y las microplacas se guardaron en bolsas a 4°C , hasta el momento de identificar las diluciones de virus que tuvieron capacidad de infectar las monocapas de células, para lo cual se detectó la presencia de antígenos virales aplicando la prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta (IPI).

Tinción de antígenos virales por prueba de IPI

Las células se rehidrataron con 50 μ l de “*buffer*” de Lavado (0,9 ml Tween 80 25% / 400 ml PBS pH 7,6) por 10 minutos. Luego de eliminar el “*buffer*” de Lavado, se agregó 50 μ l de una mezcla de cuatro anticuerpos monoclonales anti VDVB (MabMix WB103-WB112-WB166-WB214 1mg/ml agua) en una dilución 1:500 en “*buffer*” Dilución (0,0180g de NaH₂PO₄.H₂O (MERCK), 0,15g de Na₂HPO₄.2H₂O (MERCK), 2,95g de NaCl (MERCK), 100ml de agua csp, 4 ml de Tween 80 25%), y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. Luego de retirar la mezcla de anticuerpos monoclonales, las células se lavaron dos veces con 50 μ l de “*buffer*” PBS pH 7,6 (cinco minutos cada lavado) y se agregó 50 μ l de Peroxidasa de Rábano Picante (HRP, conjugado a IgG cabra anti IgG ratón 500 μ l/ml), Cat. N° 22185 (Invitrogen™) diluida 1:500 en reactivo de bloqueo, Cat. N° 22185 (Invitrogen™) 1% en “*buffer*” PBS pH 7,6 y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Luego de eliminar esta solución y lavar las células dos veces con “*buffer*” PBS pH 7,6 (cinco minutos cada lavado), se agregó 50 μ l de sustrato, compuesto por 0,6 mg/ml de DAB (3,3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma-Aldrich®) y 0,4 mg/ml de perborato de sodio tetrahidrato (BNaO₃.4H₂O, Fluka®) en “*buffer*” PBS pH 7,6. Luego, se incubó a temperatura ambiente hasta desarrollo de color en las células infectadas.

Luego de lavar las células con 100 μ l de “*buffer*” PBS pH 7,6, se observaron en un microscopio óptico Nikon eclipse TS 100. La presencia de antígenos virales se determinó por la presencia de un precipitado insoluble de color marrón en el citoplasma celular.

Para conocer el título infeccioso de cada aislado viral se usó el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938), método que tiene por finalidad ubicar la posición central en una serie ordenada de datos, quedando el 50% de las observaciones bajo ese valor, es decir, corresponde al cálculo de la mediana en una serie agrupada o distribución de frecuencias. Esta representa el valor recíproco de la dilución viral en el que hay infección del 50% de los cultivos infectados. Para encontrar la dilución precisa que provoca el 50% de efecto (mortalidad, tinción celular, etc.), entre dos diluciones, se calcula la Distancia Proporcional (DP), la que se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$DP = \frac{\% \text{ efecto } > 50\% - 50}{\% \text{ efecto } > 50\% - \% \text{ efecto } < 50\%}$$

El logaritmo de la dilución que provoca efecto en el 50% de la población expuesta, en este caso, los cultivos celulares infectados con VDVB, es igual al logaritmo negativo de la dilución que produce >50% de efecto, más la DP, multiplicado por el logaritmo del factor de dilución.

Luego de graficar las $DICT_{50}$ v/s el tiempo de infección, para cada virus se determinó el promedio de la duración de la multiplicación viral en horas y la eficiencia en la síntesis de viriones. Para determinar si existen o no diferencias significativas en la eficiencia replicativa de cada aislado, los valores obtenidos se sometieron a un análisis de varianza para comparación de promedios y comparaciones múltiples a posteriori de Tukey para lo cual se utilizó el programa InfoStat[®] (Di Rienzo *et al.*, 2008).

INDICADORES DE EFICIENCIA REPLICATIVA VIRAL

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

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

- **Período de multiplicación viral (hpi) (T):** corresponde al tiempo transcurrido desde el fin del periodo de adsorción (tiempo 0) hasta el tiempo en que se alcanza la producción máxima de virus infecciosos (Tf). Para tener un criterio común para todos los aislados virales y asegurarse que los virus se encontraban en activo proceso de multiplicación (sin limitantes de células disponibles), Tf se consideró como el último tiempo, de tres mediciones consecutivas, en que hay un aumento en la cantidad de progenie viral, en dos de las tres mediciones.

- **Producción máxima de viriones ($\text{DICT}_{50}/\text{ml}$) (P):** corresponde al título viral máximo de progenie obtenido en la cinética de multiplicación viral.
- **Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral ($\text{DICT}_{50}/\text{ml}/\text{hora}$) (V):** corresponde al cociente entre la producción máxima de virus infecciosos y el período de multiplicación viral.
- **Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral (M):** corresponde a las pendientes obtenidas desde las curvas de crecimiento exponencial de cada uno de los aislados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de esta Memoria de Título fue determinar si existían diferencias en la eficiencia de replicación de aislados de bovinos de los distintos subgenotipos y genotipos del VDVB presentes en la zona central y sur del país, regiones que agrupan la mayor cantidad del ganado bovino existente en Chile.

Los aislados se obtuvieron de animales infectados en forma natural, con signología que los hacían sospechosos de estar infectados con el virus (diarrea, aborto, repetición de celo), así como también de animales sanos o asintomáticos, por ser posibles PI.

Los diez aislados virales utilizados en esta Memoria de Título se encontraban congelados en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile a -80°C . Estos aislados pertenecen a los dos genotipos (VDVB-1 y VDVB-2) y los cinco subgenotipos detectados en el país (1a, 1b, 1i, 1j y 2a).

Los aislados virales se reactivaron y se multiplicaron en cultivos celulares de la línea MDBK, libres de infección por VDVB, en botellas de vidrio de 100 ml, hasta obtener un título viral lo suficientemente alto como para realizar los ensayos contemplados en esta memoria. Para cada uno de los aislados virales se realizó un total de cuatro pasajes.

Para determinar la eficiencia de multiplicación viral de cada uno de los aislados, se utilizaron los siguientes indicadores: **Producción máxima de viriones ($\text{DICT}_{50}/\text{ml}$) (P), Período de multiplicación viral (hpi) (T), Velocidad de síntesis de viriones (V), en que $V=P/T$ y la Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral (M).**

Debido a que los diez aislados virales analizados en esta Memoria son virus NCP, para detectar la infección viral de las células se ocupó la prueba de IPI, que detecta determinantes antigénicos del virus. La prueba IPI se hizo en cuadruplicado para cada punto de la cinética de multiplicación viral. El promedio y los títulos virales para cada tiempo post-infección se calcularon por el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938). Los títulos virales promedios obtenidos de los distintos aislados fluctuaron entre 316 y 10.000.000 $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$.

Cuadro N° 2: Títulos virales promedios de aislados nacionales del Virus Diarrea Viral Bovina obtenidos de bovinos naturalmente infectados

Aislado viral	Subgenotipo	Título viral DICT ₅₀ /ml/hora								
		0	12	24	36	48	60	72	84	96
916	VDVB 1a	0	17.783	100.000	1.778.279	1.778.279	10.000.000	5.623.413	1.778.279	5.623.413
1091	VDVB 1a	0	316	5.623	100.000	100.000	316.228	316.228	562.341	316.228
113	VDVB 1b	0	0	676	1.445	6.761	10.000	56.234	31.623	56.234
1025	VDVB 1b	0	0	562	10.000	31.623	177.828	56.234	177.828	177.828
921	VDVB 1i	0	0	562	1.000	5.623	17.783	31.623	31.623	10.000
1068	VDVB 1i	0	0	0	3.162	10.000	10.000	17.783	31.623	56.234
511	VDVB 1j	0	1.000	10.000	177.828	562.341	562.341	1.778.279	316.228	562.341
1087	VDVB 1j	0	1.778	100.000	177.828	1.000.000	3.162.277	3.162.277	1.000.000	1.000.000
470	VDVB 2a	0	0	5.623	56.234	100.000	1.778.279	5.623.413	5.623.413	1.778.279
809	VDVB 2a	0	0	562	3.162	17.783	100.000	177.828	1.000.000	56.234

Los títulos virales para cada tiempo de post- infección de los diez aislados virales se graficaron para determinar la cinética de multiplicación viral de múltiples pasos (Figuras N^{os} 2, 3, 4, 5 y 6), de los cuales se determinaron los indicadores de eficiencia de síntesis viral.

Figura N^o 2: Cinética de multiplicación de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina 1a

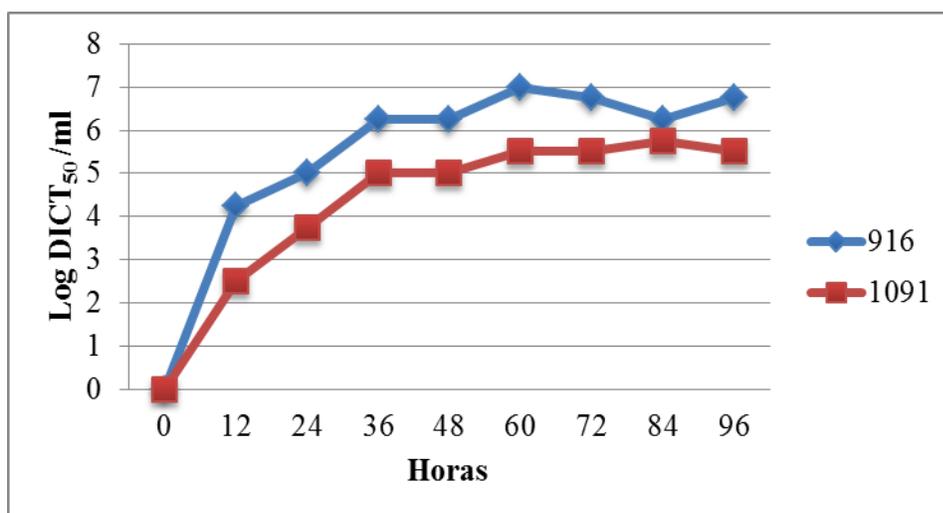


Figura N^o 3: Cinética de multiplicación de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina 1b

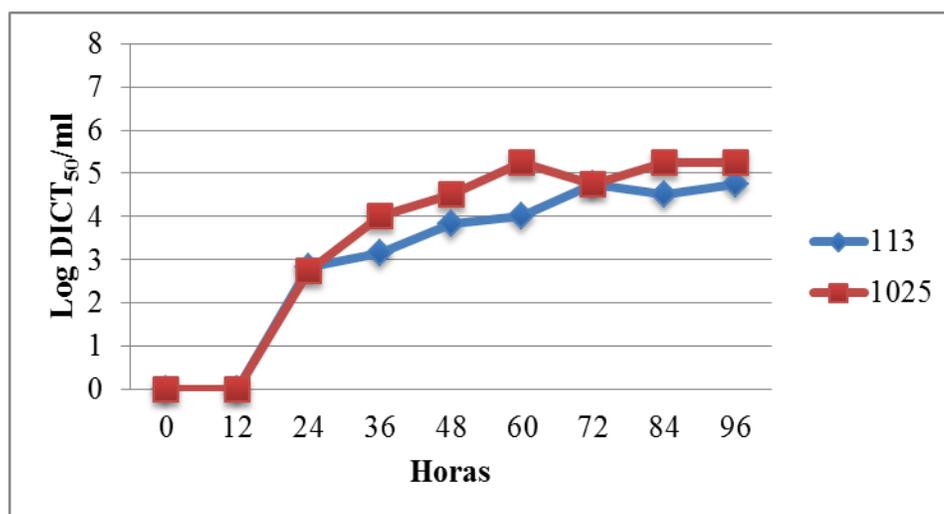


Figura N° 4: Cinética de multiplicación de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina 1i

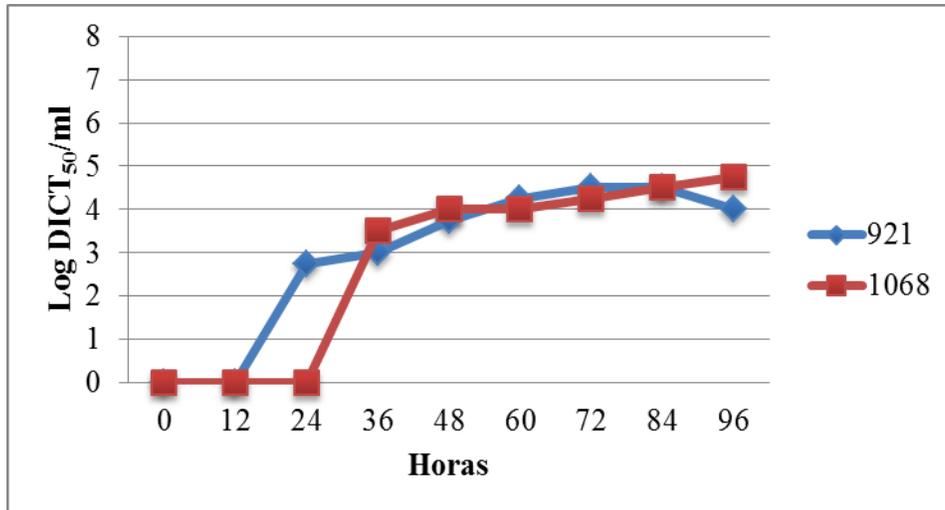


Figura N° 5: Cinética de multiplicación de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina 1j

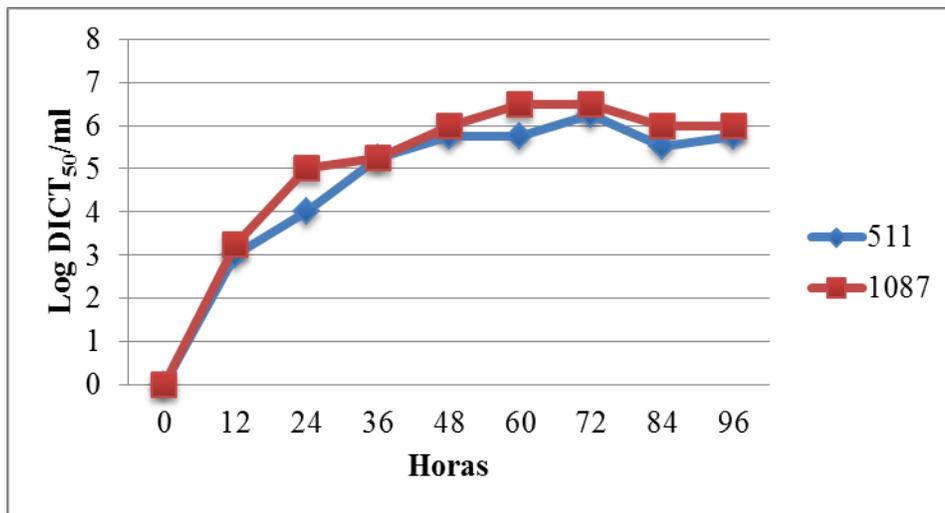
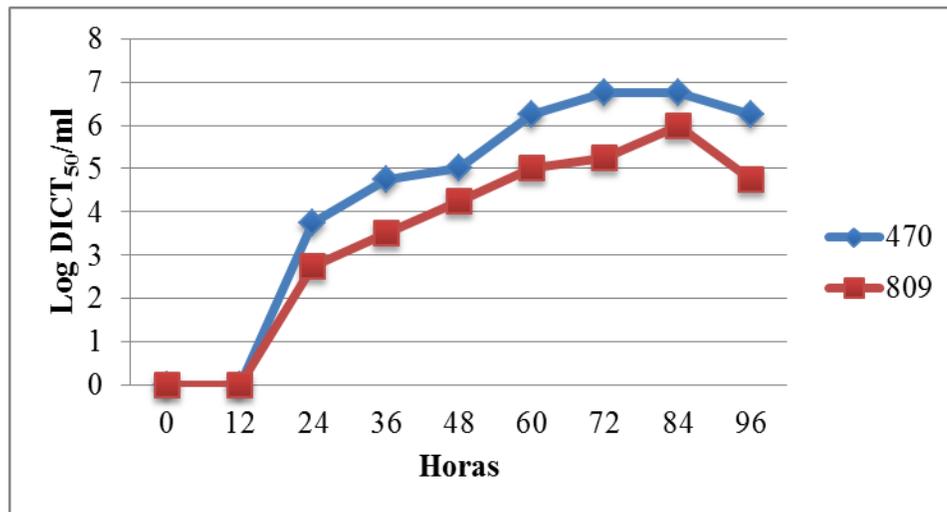


Figura N° 6: Cinética de multiplicación de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina 2a



Al analizar las cinéticas de multiplicación de los aislados virales, los virus pertenecientes a los cinco subgenotipos en estudio se pueden segregar en dos grupos, de acuerdo al tiempo que demoran en producir una nueva progenie viral (nuevos viriones).

Los aislados pertenecientes a los subgenotipos 1a y 1j (Figuras N°s 2 y 5) ya a las 12 hpi han sintetizado progenie viral, mientras que los aislados pertenecientes a los subgenotipos 1b, 1i y 2a necesitan un mínimo de 24 hpi para generar una progenie viral detectable (Figuras N°s 3, 4 y 6), incluso, para el aislado 1068, perteneciente al subgenotipo 1i, recién pasadas las 36 hpi se puede detectar progenie viral. Por lo tanto, en una primera aproximación, a los subgenotipos estudiados los podemos clasificar en dos grupos: virus de multiplicación rápida (subgenotipos 1a y 1j) y lenta (subgenotipos 1b, 1i y 2a).

INDICADORES DE EFICIENCIA REPLICATIVA VIRAL

El **período de multiplicación viral (T)** corresponde al tiempo transcurrido entre el inicio de la infección viral y el tiempo en que se alcanza la máxima producción de viriones. Para los aislados en estudio, mostrados en el Cuadro N° 3 y la Figura N° 7, los tiempos se ubicaron en un rango entre 45 (916 y 511) y 75 (809) hpi. Mientras que para los

subgenotipos, mostrados en el Cuadro N° 4 y la Figura N° 8, este rango fue entre 47 (VDVB 1a) y 72 (VDVB 2a) hpi. Cualitativamente, de acuerdo a este indicador, los aislados pueden clasificarse en dos grupos: un grupo formado por los virus de los subgenotipos 1a y 1j con un T entre 47 y 48 hpi; y otro grupo formado por los virus de los subgenotipos 1b, 1i y 2a con un T entre 56 y 72 hpi.

Esta segregación de subgenotipos virales concuerda con lo observado con la producción de progenie viral, donde los subgenotipos 1a y 1j sintetizan precozmente progenie viral (12 hpi) y se demoran un menor tiempo en alcanzar el punto máximo de producción viral. Los subgenotipos 1b, 1i y 2a demoran más tiempo en sintetizar su progenie, así como también en lograr la máxima producción. Por otra parte, cabe destacar que en general ambos aislados de cada subgenotipo se comportan de manera similar, manteniéndose la diferencia existente entre los virus de multiplicación rápida y lenta.

Considerando el menor tiempo que demoran los subgenotipos 1a y 1j en producir una nueva progenie viral y alcanzar el punto máximo de producción viral, para estos indicadores, estos virus tendrían una mayor eficiencia replicativa, y por lo tanto una mayor virulencia potencial que los subgenotipos 1b, 1i y 2a, debido a que cuando un virus genera rápidamente progenie viral en el individuo infectado, favorece la diseminación del virus en el organismo y compite más eficientemente frente a la respuesta inmune del hospedero.

Sin embargo, al realizar el análisis estadístico, solo se encontró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los aislados 916 y 511 respecto del aislado 809 (Cuadro N° 11) pertenecientes a los subgenotipos 1a, 1j y 2a respectivamente. Estas diferencias se mantienen al hacer el análisis por subgenotipos (Cuadro N° 12), donde el T observado en los subgenotipos 1a y 1j es estadísticamente diferente al que presenta el subgenotipo 2a. El resto de los aislados y subgenotipos no muestran diferencias significativas entre ellos.

No hay muchos estudios de cinéticas de multiplicación viral en este virus, y de estos, la mayoría son trabajos de cinética de un paso. Quetalpillán (2012), en un estudio de cinética de multiplicación viral de un paso, con aislados de VDVB obtenidos de camélidos sudamericanos (CSA), encontró que el periodo de producción máxima de viriones fluctuó entre 26,2 a igual o más de 36 hpi, con un promedio de 33,7 hpi para el subgenotipo 1b,

34,1 hpi para el subgenotipo 1j y 30,5 horas para el genotipo 2a. El período correspondiente al subgenotipo 2a fue significativamente diferente al del subgenotipo 1j y al del subgenotipo 1b. El período entre los subgenotipos 1b y 1j no tiene diferencias estadísticas significativas. Montt (2004), para aislados de VDVB de bovinos alcanzó la producción máxima de viriones a las 24 hpi para el subgenotipo 1b, nueve hpi para el subgenotipo 1j y a las 12 hpi para el subgenotipo 2a.

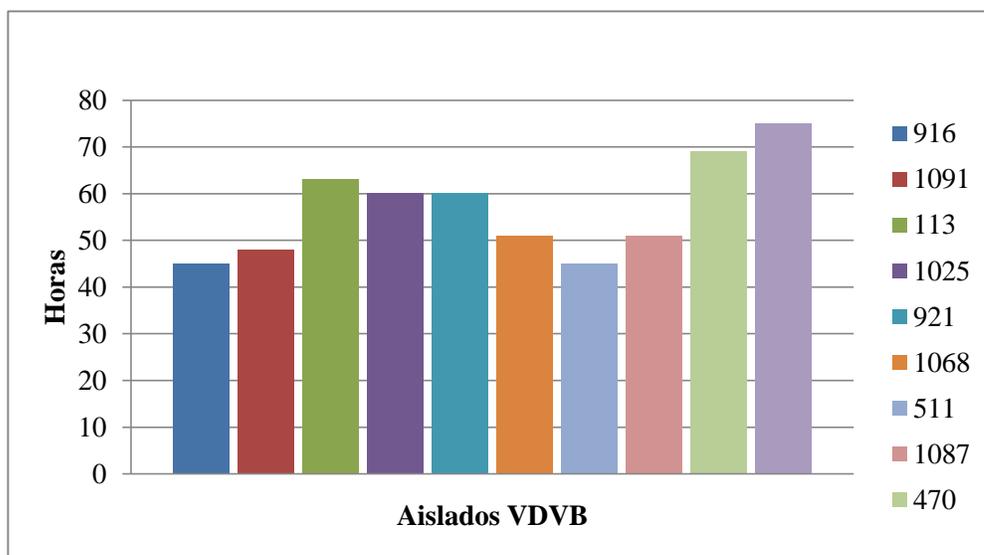
Mittelholzer (2000), en un trabajo realizado con VPPC, encontró períodos que van entre seis a nueve hpi para aislados de alta virulencia, y de nueve a 12 hpi para aislados de mediana a baja virulencia. Según estos antecedentes, se observa que entre los aislados de VDVB existen diferencias en el tiempo que demoran en producir una nueva progenie viral y alcanzar la máxima producción de viriones.

Cuadro N° 3: Período de multiplicación viral de aislados de Virus Diarrea Viral Bovina

Aislado Viral	Subgenotipo	*T
916	VDVB 1a	45
1091	VDVB 1a	48
113	VDVB 1b	63
1025	VDVB 1b	60
921	VDVB 1i	60
1068	VDVB 1i	51
511	VDVB 1j	45
1087	VDVB 1j	51
470	VDVB 2a	69
809	VDVB 2a	75

* T: Período de multiplicación viral (hpi) correspondiente a un promedio de cuatro mediciones.

Figura N° 7: Período de multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina

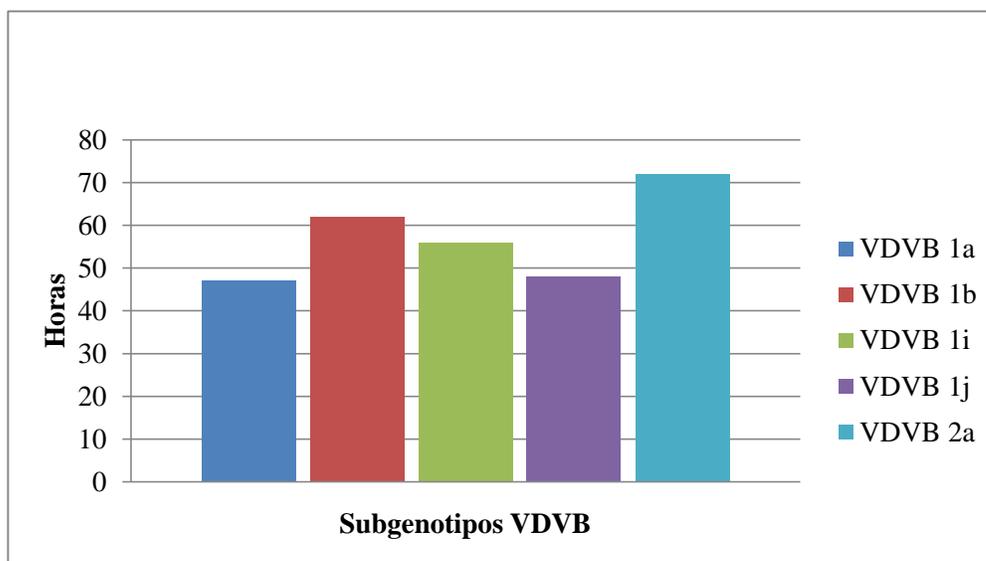


Cuadro N° 4: Período de multiplicación viral de aislados de Virus Diarrea Viral Bovina por subgenotipos

Subgenotipo	*T
VDVB 1a	47
VDVB 1b	62
VDVB 1i	56
VDVB 1j	48
VDVB 2a	72

*T: Período de multiplicación viral (hpi) correspondiente a un promedio de cuatro mediciones.

Figura N° 8: Período de multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina



La **producción máxima de virus infecciosos (P)** es definida como el título viral máximo de progenie viral obtenido en la cinética de multiplicación viral. Para este indicador, los títulos virales fluctuaron entre 102.774 DICT₅₀/ml y 31.622.777 DICT₅₀/ml, siendo los aislados 921 y 1068 los que obtuvieron una menor producción viral, mientras que el aislado 916 fue el que alcanzó una mayor producción. Estos aislados pertenecen a los subgenotipos 1i y 1a respectivamente (Cuadro N° 5 y Figura N° 9). Los títulos virales alcanzados por subgenotipos fluctuaron entre 102.774 DICT₅₀/ml para el subgenotipo 1i hasta 16.681.015 DICT₅₀/ml para el subgenotipo 1a (Cuadro N°6 y Figura N° 10). Al observar el Cuadro N° 5 y la Figura N° 9, se aprecia una diferencia marcada en el título viral alcanzado por el aislado 916 en comparación con el aislado 1091, con títulos virales de 31.622.777 DICT₅₀/ml y 1.739.253 DICT₅₀/ml (18,1 veces), respectivamente, perteneciendo los dos aislados al subgenotipo 1a. Una situación similar se observa entre los aislados 470 (17.392.528 DICT₅₀/ml) y 809 (1.739.253 DICT₅₀/ml), ambos pertenecientes al subgenotipo 2a, mostrando una diferencia de aproximadamente 10 veces entre ellos. Entre los aislados 113 y 1025 pertenecientes al subgenotipo 1b, con 173.926 DICT₅₀/ml y

1.027.741 DICT₅₀/ml respectivamente, se observa una diferencia de aproximadamente seis veces entre ellos. En relación a la P por subgenotipos, esta se encontró entre 102.774 DICT₅₀/ml y 16.681.015 DICT₅₀/ml (Cuadro N° 6 y Figura N° 10).

En términos cualitativos, los virus de los subgenotipos 1a y 1j presentan un P mayor que el de los subgenotipos 1b y 1i, manteniendo la tendencia observada con los indicadores anteriores, sin embargo los virus del subgenotipo 2a también presentan un alto P, que se explica por el valor observado para el aislado 470.

El análisis estadístico determinó que la diferencia observada entre los aislados que lograron la mayor producción de virus infecciosos, 916 y 470, así como también entre estos y el resto de los aislados es significativa ($p \leq 0,05$), situación que no se observa entre los aislados 113 y 1025, ni en los resultados obtenidos por los demás aislados analizados (Cuadro N° 11). La producción máxima de virus infecciosos medida por subgenotipos solo muestra diferencias significativas entre el subgenotipo 1a respecto de los subgenotipos 1b, 1i y 1j. A pesar de que la diferencia que existe entre el subgenotipo 2a y los subgenotipos 1b, 1i y 1j (Figura N° 10) es considerable, esta no llega a ser estadísticamente significativa.

Un virus con un alto P tendría una mayor eficiencia replicativa, y por lo tanto, potencialmente una mayor virulencia en comparación con un virus que no se multiplique en gran cantidad, ya que al sintetizar una mayor cantidad de viriones, mayores posibilidades tendría diseminarse rápidamente en el individuo infectado y de superar al sistema inmune.

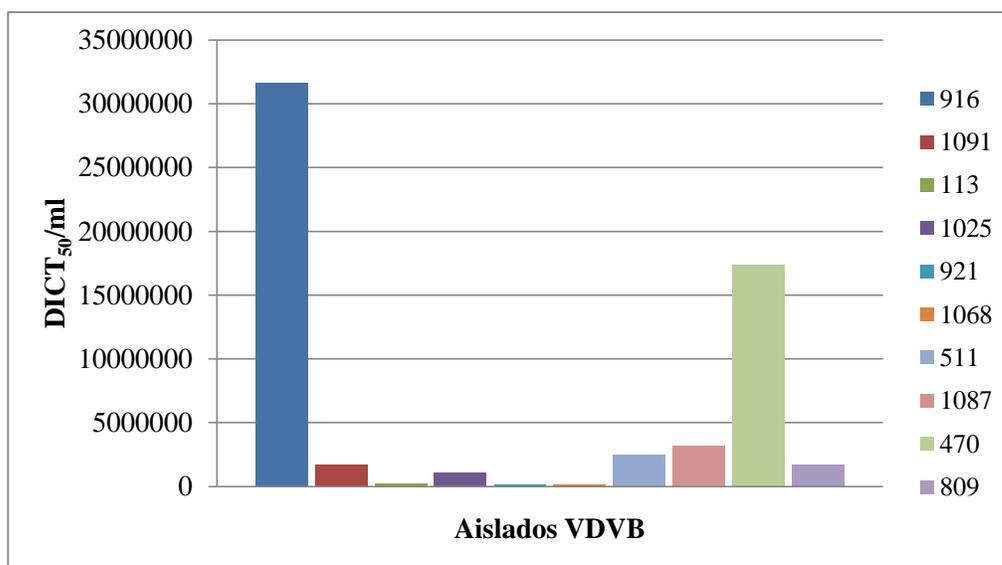
Respecto a P, Quetalpillán (2102), encontró valores de 15.849 DICT₅₀/ml, 1.258.925 DICT₅₀/ml y 39.811 DICT₅₀/ml para los subgenotipos 1b, 1j y 2a respectivamente, donde el subgenotipo 1j fue estadísticamente diferente en relación con los subgenotipos 1b y 2a. Montt (2004), encontró una producción viral de 630.957 DICT₅₀/ml para aislados pertenecientes a los subgenotipos 1b y 1j, mientras que para aislados del subgenotipo 2a este valor fue de 63.096 DICT₅₀/ml. En comparación con los resultados obtenidos en este experimento, estos valores fueron de 600.834 DICT₅₀/ml; 2.806.522 DICT₅₀/ml y 9.565.891 DICT₅₀/ml para los subgenotipos 1b, 1j y 2a respectivamente, mostrando diferencias en los valores obtenidos en los tres trabajos.

Cuadro N° 5: Producción máxima de virus infecciosos de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina

Aislado viral	Subgenotipo	*P
916	VDVB 1a	31.622.777
1091	VDVB 1a	1.739.253
113	VDVB 1b	173.926
1025	VDVB 1b	1.027.741
921	VDVB 1i	102.774
1068	VDVB 1i	102.774
511	VDVB 1j	2.450.766
1087	VDVB 1j	3.162.278
470	VDVB 2a	17.392.528
809	VDVB 2a	1.739.253

*P: Producción máxima de virus infecciosos (DICT₅₀/ml) correspondiente a un promedio de cuatro mediciones.

Figura N° 9: Producción máxima de virus infecciosos de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina

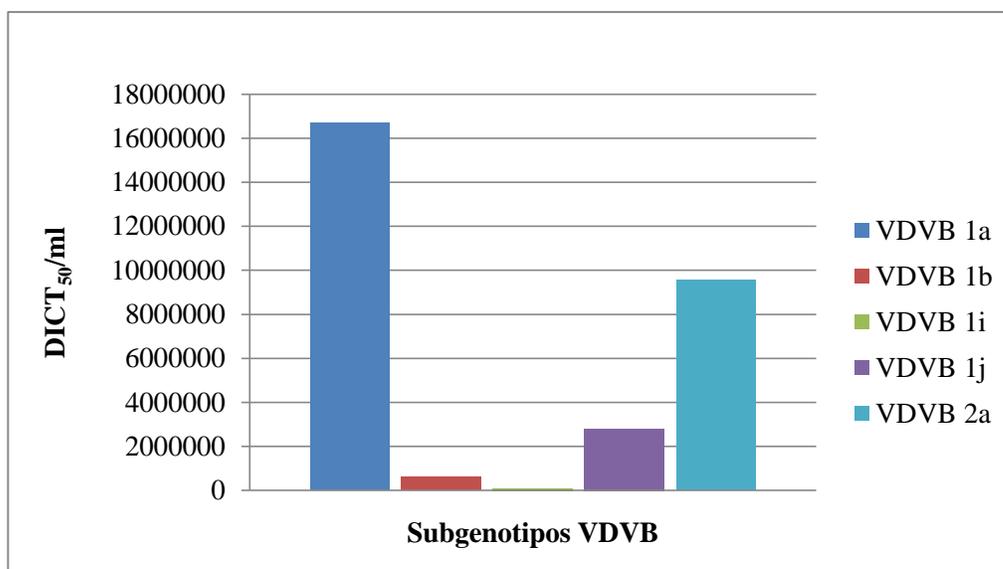


Cuadro N° 6: Producción máxima de virus infecciosos de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina por subgenotipos

Subgenotipo	*P
VDVB 1a	16.681.015
VDVB 1b	600.834
VDVB 1i	102.774
VDVB 1j	2.806.522
VDVB 2a	9.565.891

*P: Producción máxima de virus infecciosos (DICT₅₀/ml) correspondiente a un promedio de cuatro mediciones.

Figura N° 10: Producción máxima de virus infecciosos de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina



La **velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral (DICT₅₀/ml/hora) (V)**, que corresponde al cociente entre P y T, según lo indicado por el Cuadro N° 7 y la Figura N° 11, se encuentra entre 1.526 DICT₅₀/ml/hora y 735.668 DICT₅₀/ml/hora, correspondientes a los aislados 921 (subgenotipo 1i) y 916 (subgenotipo 1a) respectivamente. En términos cualitativos, se observan dos grupos de virus, aquellos que poseen una alta velocidad de síntesis de viriones, formado por los virus 916 (735.668 DICT₅₀/ml/hora), 1091 (46.556 DICT₅₀/ml/hora), 1025 (20.203 DICT₅₀/ml/hora), 511 (53.802 DICT₅₀/ml/hora), 1087 (64.782 DICT₅₀/ml/hora), 470 (243.759 DICT₅₀/ml/hora) y 809 (21.239 DICT₅₀/ml/hora), pertenecientes a los subgenotipos 1a, 1b, 1j y 2a, respectivamente; y un segundo grupo, formado por los virus con una velocidad de síntesis de viriones baja, donde se encuentran los aislados 113 (3.514 DICT₅₀/ml/hora), 921 (1.526 DICT₅₀/ml/hora) y 1068 (2.141 DICT₅₀/ml/hora), que pertenecen a los subgenotipos 1b y 1i.

La V por subgenotipos fluctuó entre 1.834 DICT₅₀/ml/hora y 391.112 DICT₅₀/ml/hora (Cuadro N° 8 y Figura N° 12), correspondientes a los subgenotipos 1i y 1a. De acuerdo a los valores observados se mantiene la diferenciación de los subgenotipos en 2 grupos. Los que lograron una mayor V fueron los subgenotipos 1a, 1j y 2a con 391.112 DICT₅₀/ml/hora, 59.292 DICT₅₀/ml/hora y 132.499 DICT₅₀/ml/hora, respectivamente. Los subgenotipos 1b con 11.859 DICT₅₀/ml/hora y 1i con 1.834 DICT₅₀/ml/hora forman parte del segundo grupo con una V menor. Dentro del subgenotipo 1a, que muestra una alta eficiencia replicativa, los aislados 916 y 1091 muestran entre ellos una amplia diferencia en el valor alcanzado, indicando una alta variabilidad entre virus del mismo subgenotipo. Esto mismo se repite al observar los aislados 470 y 809, pertenecientes al subgenotipo 2a, aunque a menor escala, donde el aislado 809 no se comporta de la misma manera que el aislado 470. Para los subgenotipos con menor V (1b y 1i), se observa que los aislados que los componen se comportan de manera similar solo en el caso del subgenotipo 1i.

El análisis estadístico (Cuadros N°s 11 y 12) encontró diferencias significativas tanto entre los aislados como entre los subgenotipos, donde tenemos que el aislado 916 es distinto estadísticamente de todo el resto de aislados analizados. Los aislados 921, 1068 y 113, con una V menor, solo presentan diferencias significativas con los dos aislados que lograron la mayor V (916 y 470). Los subgenotipos 1b, 1i y 1j muestran una diferencia significativa con el aislado de mayor V que fue el subgenotipo 1a y el subgenotipo 2a no presenta diferencias significativas con el resto.

Según este indicador, los virus con un V mayor, serían potencialmente más virulentos. Los virus al sintetizar una mayor cantidad de viriones en un tiempo determinado, tendrán una mayor capacidad para superar la respuesta inmune montada por el hospedero y diseminarse más eficientemente en el organismo.

Los valores obtenidos por Quetalpillán (2012) para esta variable fueron de 1.057 DICT₅₀/ml/hora para el subgenotipo 1b, 99.368 DICT₅₀/ml/hora para el subgenotipo 1j, y de 2.558 DICT₅₀/ml/hora para el subgenotipo 2a, diferencia que fue estadísticamente significativa, valores muy inferiores a los que se presentan en este estudio, sin embargo, el

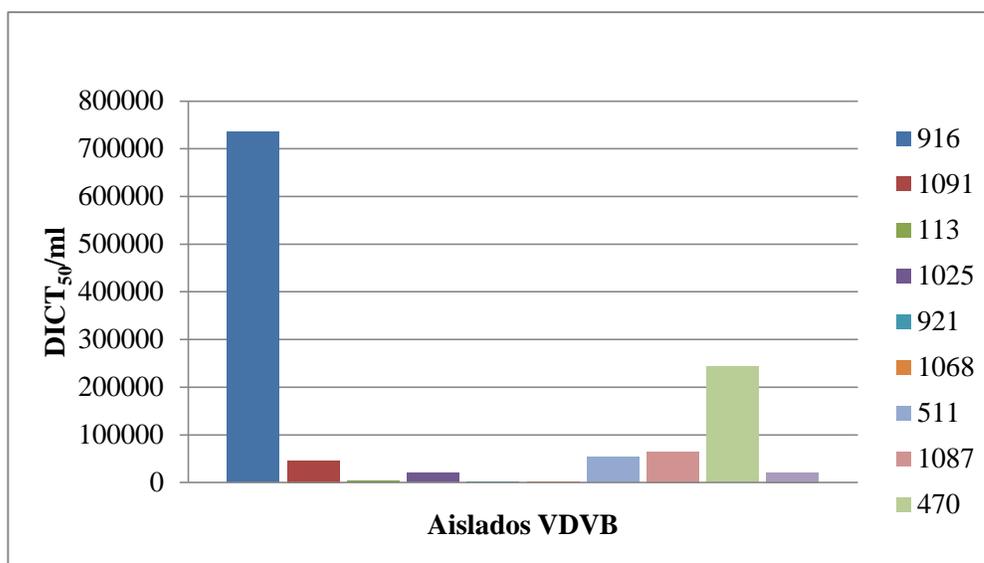
hecho de que sea una cinética de multiplicación de un paso, podría explicar en parte la poca producción viral alcanzada ya que el tiempo de estudio es considerablemente menor.

Cuadro N° 7: Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina

Aislado viral	Subgenotipo	*V
916	VDVB 1a	735.668
1091	VDVB 1a	46.556
113	VDVB 1b	3.514
1025	VDVB 1b	20.203
921	VDVB 1i	1.526
1068	VDVB 1i	2.141
511	VDVB 1j	53.802
1087	VDVB 1j	64.782
470	VDVB 2a	243.759
809	VDVB 2a	21.239

*V: Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral (DICT₅₀/ml/hora) correspondiente a un promedio de 4 mediciones.

Figura N° 11: Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina

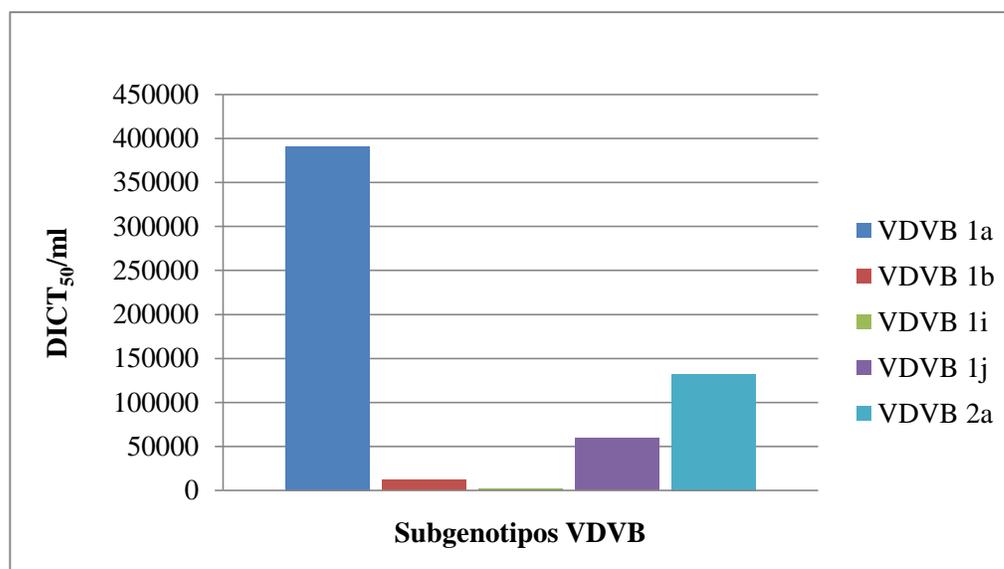


Cuadro N° 8: Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral de aislados del Virus diarrea Viral Bovina por subgenotipos

Subgenotipo	*V
VDVB 1a	391.112
VDVB 1b	11.859
VDVB 1i	1.834
VDVB 1j	59.292
VDVB 2a	132.499

*V: Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral (DICT₅₀/ml/hora) correspondiente a un promedio de 4 mediciones.

Figura N° 12: Velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina



En relación a la **pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral (M)**, se observan valores que van entre 0,07 para el aislado 113 y 0,21 para el aislado 1087 (Cuadro N° 9 y Figura N° 13). Para los valores por subgenotipos, estos estuvieron entre 0,1 y 0,17 (Cuadro N° 10 y Figura N° 14) que corresponden a los subgenotipos 1b y 1a respectivamente. El aislado 1087 (subgenotipo 1j) no corresponde al mismo subgenotipo que alcanza el valor máximo en el análisis por subgenotipos. El análisis estadístico de esta variable muestra diferencias significativas entre los aislados y los subgenotipos, siendo esta variable la que muestra más diferencias entre virus y subgenotipos virales. Los aislados 113 y 921 (subgenotipos 1b y 1i respectivamente), que muestran las menores pendientes obtenidas, son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$) del resto de los aislados analizados. Asimismo, el aislado 1087 (subgenotipo 1j) muestra una diferencia significativa con todos los demás aislados, a excepción del aislado 916 (subgenotipo 1a), siendo estos los que alcanzan las mayores pendientes del grupo en estudio (Cuadro N° 11). En relación a los valores obtenidos por subgenotipos, se aprecia que el subgenotipo 1b, con la menor

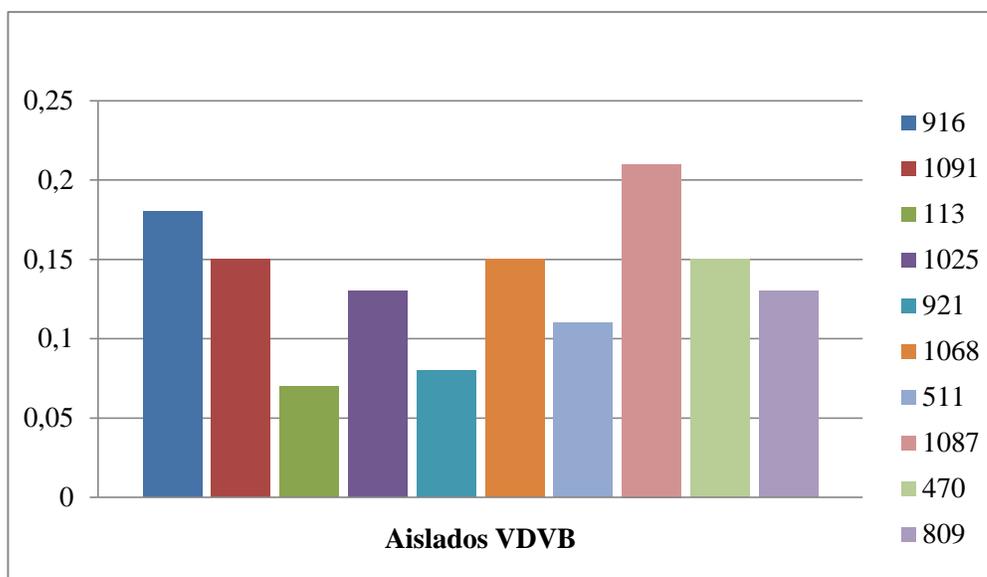
pendiente, es estadísticamente diferente de los subgenotipos 1j y 1a, que obtuvieron las pendientes más altas. El subgenotipo 1i, solo muestra diferencias con el subgenotipo 1a y el subgenotipo 2a no presenta diferencias significativas con ninguno de los subgenotipos estudiados (Cuadro N° 12).

Cuadro N° 9: Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina

Aislado Viral	Subgenotipo	*M
916	VDVB 1a	0,18
1091	VDVB 1a	0,15
113	VDVB 1b	0,07
1025	VDVB 1b	0,13
921	VDVB 1i	0,08
1068	VDVB 1i	0,15
511	VDVB 1j	0,11
1087	VDVB 1j	0,21
470	VDVB 2a	0,15
809	VDVB 2a	0,13

*M: Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral correspondiente a un promedio de cuatro mediciones.

Figura N° 13: Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina

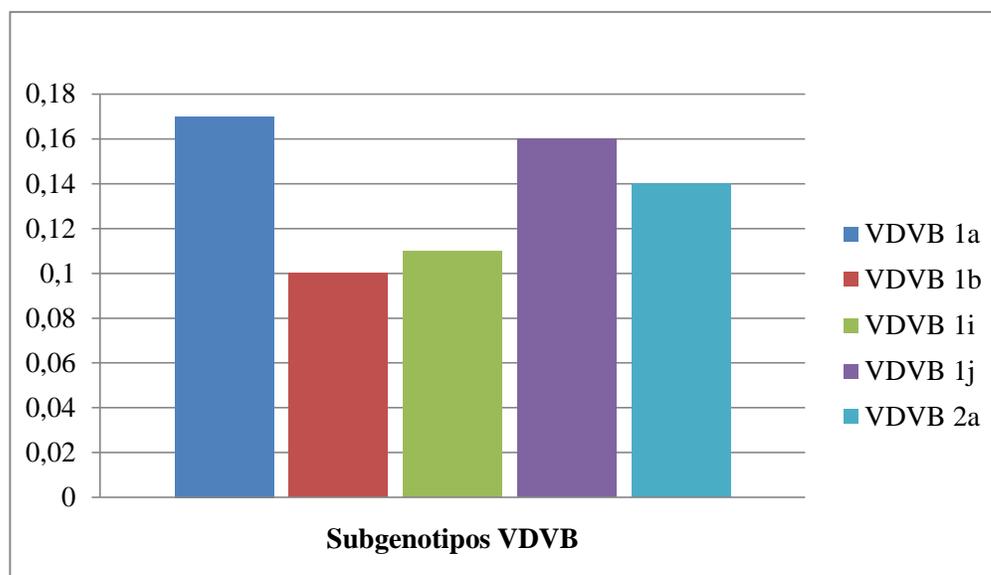


Cuadro N° 10: Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina por subgenotipos

Subgenotipo	*M
VDVB 1a	0,17
VDVB1b	0,1
VDVB 1i	0,11
VDVB 1j	0,16
VDVB 2a	0,14

*M: Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral correspondiente a un promedio de cuatro mediciones.

Figura N° 14: Pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral de aislados del Virus Diarrea Viral Bovina



El análisis de la cinética de multiplicación de los aislados nacionales pertenecientes a los subgenotipos 1a, 1b, 1i, 1j y 2a del VDVB, obtenidos de bovinos infectados en forma natural, mostró que los virus presentan diferencias importantes, tanto entre subgenotipos como intra subgenotipos.

Así, por ejemplo, los virus de los subgenotipos 1a y 1j son capaces de completar su ciclo infectivo, formando progenie viral, a las 12 hpi, lo que no ocurre con los virus de los subgenotipos 1b, 1i y 2a. Esto indicaría que los virus de los subgenotipos 1a y 1j tendrían una mayor eficiencia replicativa, lo que puede ser a nivel de entrada del virus a la célula, síntesis de las proteínas virales, replicación del genoma viral, ensamble de la partícula viral y/o de la liberación de la progenie viral desde la célula infectada. Además, esta característica estaría asociada a los subgenotipos virales, ya que los dos virus de cada subgenotipo se comportan de la misma manera.

Este comportamiento de los virus se mantiene al observar el T para cada uno de ellos. Los virus de los subgenotipos 1a y 1j completan su multiplicación entre las 47 y 48 hpi, mientras que los virus de los subgenotipos 1b, 1i y 2a, lo hacen entre las 56 y 72 hpi, confirmando que los virus de los subgenotipos 1a y 1j se multiplican más rápido que los virus de los otros subgenotipos, lo que les otorga una ventaja en términos de diseminación dentro del individuo infectado. Esta condición les otorgaría a estos virus una potencial mayor virulencia que los otros virus del VDVB.

Al analizar P, el comportamiento de los virus difiere de lo observado anteriormente. En este caso, existe una mayor variabilidad entre los virus pertenecientes a un mismo subgenotipo, lo que se observa especialmente en los subgenotipos 1a y 2a. A nivel de subgenotipos, los virus del subgenotipo 1i presentan claramente una menor P (102.774 DICT₅₀/ml) que los otros virus estudiados en este trabajo, los que, a excepción de los virus 916 y 470, presentan una P similar, entre 1.027.741 (1025) y 3.162.278 (1087) DICT₅₀/ml. Por lo tanto, basados en este indicador, podemos decir que los virus del subgenotipo 1i serían los virus con menor eficiencia replicativa y los virus 916 (1a) y 470 (2a) los más eficientes. Al excluir del análisis estadístico los aislados 916 y 470, los virus del subgenotipo 1j presentan una mayor P que los virus de los subgenotipos 1b y 1i, diferencia que es significativa (Cuadro N° 14), y por consiguiente tienen una mayor eficiencia replicativa.

Al conjugar ambos indicadores en V, nuevamente se observa una alta variabilidad entre los virus pertenecientes a los subgenotipos 1a y 2a, explicado por los valores de P. A nivel de subgenotipos, los virus del subgenotipo 1i presentan claramente una menor V (1.834 DICT₅₀/ml/hora) que los demás virus estudiados en esta Memoria. Al excluir del análisis estadístico los aislados 916 y 470, los virus del subgenotipo 1j presentan una mayor V que los virus de los subgenotipos 1b y 1i y por consiguiente una mayor eficiencia replicativa. La diferencia de los valores obtenidos por estos subgenotipos es estadísticamente significativa (Cuadro N° 14).

La M muestra que la diferencia en los valores obtenidos entre los aislados con menor pendiente (113 y 921), es estadísticamente diferente de los aislados con pendiente

mayor (916 y 1087). El subgenotipo 1a, que logra la mayor pendiente, evidencia que la diferencia con los subgenotipos 1b y 1i, con pendiente menor, es significativa.

Los resultados obtenidos en esta Memoria permiten sugerir que los virus del subgenotipo 1i serían potencialmente menos virulentos de los virus estudiados, lo que se explicaría por alguna característica del ciclo infectivo viral conservada dentro del subgenotipo. Por otra parte, la variabilidad observada de algunos indicadores entre virus del mismo subgenotipo, sugiere la necesidad de realizar estos estudios con un mayor número de virus por subgenotipo.

A futuro, se hace necesario estudiar las distintas etapas del ciclo infectivo viral, para determinar los eventos moleculares específicos que expliquen las diferencias encontradas en algunos indicadores para los virus estudiados.

Cuadro N° 11: Medidas estadísticas para los indicadores de eficiencia replicativa por aislado viral

		T		P		V		M	
Aislado viral	Subgenotipo	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
916	VDVB 1a	45 *(A)	11,5	5.931.177 *(B)*(C)	2.000.145	735.668 (C)	173.380	0,18 *(D)*(E)	0,03
1091	VDVB 1a	48 (A)(B)	13,9	1.739.253 (A)	1.643.168	46.556 (A)	47.672	0,15 (C)(D)	0,01
113	VDVB 1b	63 (A)(B)	18	173.926 (A)	164.317	3.514 (A)	3.977	0,07 (A)	0,01
1025	VDVB 1b	60 (A)(B)	9,8	1.027.741 (A)	1.423.025	20.203(A)	30.454	0,13 (B)(C)	0
921	VDVB 1i	60 (A)(B)	9,8	102.774 (A)	142.303	1.526 (A)	1.912	0,08 (A)	0,004
1068	VDVB 1i	51 (A)(B)	15,1	10.277 (A)	142.303	2.141 (A)	2.970	0,15 (B)(C)(D)	0,03
511	VDVB 1j	45 (A)	11,5	2.450.766 (A)(B)	1.423.025	53.802 (A)(B)(C)	33.329	0,11 (A)(B)	0,01
1087	VDVB 1j	51 (A)(B)	11,5	2.292.094 (A)(B)(C)	1.013.576	64.782 (A)(B)	16.580	0,21 (E)	0
470	VDVB 2a	69 (A)(B)	6	17.392.528 (C)	16.431.677	243.759 (B)(C)	225.711	0,15 (C)(D)	0,03
809	VDVB 2a	75 (B)	11,5	1.739.253 (A)	1.643.168	21.239 (A)	18.949	0,13 (B)(C)	0,005

*(A), (B), (C), (D) y (E) indican similitud o diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) de los diferentes indicadores de la eficiencia replicativa de los aislados de VDVB en estudio.

Cuadro N° 12: Medidas estadísticas para los indicadores de eficiencia replicativa por subgenotipo

Subgenotipo	T		P		V		M	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
VDVB 1a	47 *(A)	12	16.681.015 *(B)	16.009.595	391.112 (B)	386.699	0,17 *(C)	0,03
VDVB 1b	62 (A)(B)	14	600.834 (A)	1.042.935	11.859 (A)	21.996	0,10 (A)	0,03
VDVB 1i	56 (A)(B)	13	102.774 (A)	131.747	1.834 (A)	2.336	0,11 (A)(B)	0,04
VDVB 1j	48 (A)	11	2.806.522 (A)	1.006.231	59.292 (A)	25.066	0,16 (C)	0,05
VDVB 2a	72 (B)	9	9.565.891 (A)(B)	13.670.354	132.499 (A)(B)	190.091	0,14 (A)(B)(C)	0,02

*(A), (B) y (C) indican similitud o diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) de los diferentes indicadores de la eficiencia replicativa de los aislados de VDVB en estudio.

Cuadro N° 13: Medidas estadísticas para los indicadores P y V de eficiencia replicativa por aislado viral, excluyendo los aislados 916 y 470

		P		V	
Aislado viral	Subgenotipo	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
1091	VDVB 1a	1739253 *(A)*(B)	1.643.168	46.556 (A)(B)	47.672
113	VDVB 1b	173926 (A)	164.317	3.514 (A)	3.977
1025	VDVB 1b	1.027.741 (A)(B)	1.423.025	20.203 (A)(B)	30.454
921	VDVB 1i	102.774 (A)	142.303	1.526 (A)	1.912
1068	VDVB 1i	102.774 (A)	142.303	2.141 (A)	2.970
511	VDVB 1j	2.450.766 (A)(B)	1.423.025	53.802 (A)(B)	33.329
1087	VDVB 1j	3.162.278 (B)	0	64.782 (B)	16.580
809	VDVB 2a	1.739.253 (A)(B)	1.643.168	21.239 (A)(B)	18.949

*(A) y (B) indican similitud o diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) de los diferentes indicadores de la eficiencia replicativa de los aislados de VDVB en estudio.

Cuadro N° 14: Medidas estadísticas para los indicadores P y V de eficiencia replicativa por subgenotipo, excluyendo los aislados 916 y 470

Subgenotipo	P		V	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
VDVB 1a	1.739.253 *(A)*(B)	1.643.168	46.556 (B)*(C)	47.672
VDVB 1b	600.834 (A)	1.042.935	11.859 (A)(B)	21.996
VDVB 1i	102.774 (A)	131.747	1.834 (A)	2.336
VDVB 1j	2.806.522 (B)	1.006.231	59.292 (C)	25.066
VDVB 2a	1.739.253 (A)(B)	1.643.168	21.239 (A)(B)(C)	18.949

*(A), (B) y (C) indican similitud o diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) de los diferentes indicadores de la eficiencia replicativa de los aislados de VDVB en estudio.

CONCLUSIONES

1. Los aislados de los subgenotipos 1a y 1j se multiplican más rápido que los virus de los subgenotipos 1b, 1i y 2a y por lo tanto tienen una mayor eficiencia replicativa.
2. Al analizar el período de multiplicación viral, se encuentran diferencias en la eficiencia replicativa de los distintos aislados, lo que está asociado al subgenotipo. Los aislados de los subgenotipos 1a y 1j tienen una mayor eficiencia replicativa que los virus del subgenotipo 2a ($p \leq 0,05$).
3. Al analizar la producción máxima de viriones, se encuentran diferencias en la eficiencia replicativa de los distintos aislados, lo que no está asociado al subgenotipo. Los aislados 916 y 470 tienen una mayor eficiencia replicativa que los demás virus en estudio ($p \leq 0,05$).
4. Al analizar la velocidad de síntesis de virus infecciosos en el período de multiplicación viral, se encuentran diferencias en la eficiencia replicativa de los distintos aislados, lo que no está asociado al subgenotipo. El aislado 916 tiene una mayor eficiencia replicativa que el resto de los aislados ($p \leq 0,05$).
5. Al analizar la pendiente durante la fase exponencial de la multiplicación viral, se encuentran diferencias en la eficiencia replicativa de los distintos aislados, lo que no está asociado al subgenotipo. El aislado 1087 tiene una mayor eficiencia replicativa que los demás aislados ($p \leq 0,05$) a excepción del aislado 916.
6. Los resultados de esta memoria de título permitieron determinar la existencia de diferencias en la eficiencia replicativa de los aislados virales probados, en algunos casos asociada al subgenotipo, lo que permite predecir la existencia de cepas con distinta virulencia en el país.

BIBLIOGRAFÍA

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

- **BAKER, J.C.** 1990. Clinical aspects of bovine viral diarrhea virus infections. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9: 25-41.

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

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

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

- **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.** 1992. Données récentes sur la biologie moléculaire du pestivirus responsable de la maladie des muqueuses (BVD/MD). *Ann. Méd. Vét.* 136: 33-38.

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

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

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

- **CELEDÓN, M.; VARGAS, C.; SALINAS, A.; CASANOVA, A.; IBARRA, L.;**

BERRIOS, P. 1996. Prevalencias serológicas para el virus de la diarrea viral bovina y de la rinotraqueítis infecciosa bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. *Av. Cs. Vet.* 11: 75-80.

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

- **CELEDÓN, M.; ROCO, L.; QUINTEROS, G.; SANTIBÁÑEZ, M.; BERRIOS, P.** 1997a. Puesta en evidencia del virus de la diarrea viral bovina en bovinos clínicamente afectados. *Arch. Med. Vet.* 29: 189-195.

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

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

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

- **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.

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

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

- **DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINE, M. G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. W.** 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- **DONOSO, A.** 2009. Determinación de la variabilidad genética de aislados chilenos del Virus de la diarrea viral bovina (VDVB) por filogenia molecular de la región 5' no codificante del genoma viral. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 66p.

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

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

- **FIEDLER, H., V. CUBILLOS, E. PAREDES, G., REINHARDT, RIEDEMANN, M. NIEDDA y M. AGUILAR.** 1986. Enfermedad mucosa/diarrea viral bovina. Hallazgos anatomopatológicos de los primeros casos en Chile. *Arch. Med. Vet.* 18: 151-153.

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

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

- **GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F.** 2005. Bovine Viral Diarrhoea Virus. Diagnosis, Management, and Control. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 261 págs.

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

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

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

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

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

- **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.

- **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.

- **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.; PASTORET, P.** 1998. Evidence for biotype-specific effects of bovine viral diarrhoea virus on biological responses in acutely infected calves. *J. Gen. Virol.* 79: 27-30.

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

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

- **LÉRTORA, W. J.** 2003. Diarrea viral bovina: actualización. *Rev. Vet.* 14: 1, 42-51.

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

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

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

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

- **MONTT, J.** 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 pp.

- **MORÁN, P.; DI SANTO, M.; GORGORZA, L.** 2006. Transmisión del virus de la diarrea viral bovina. Factores de riesgo en el ingreso y diseminación en los rodeos. Rev. vet. 17: 1, 50–56.

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

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

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

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

- **PATON, D. J.; CARLSSON, U.; LOWINGS, J. P.; SANDS, J.J.; VILCEK, S.; ALENIUS, S.** 1995. Identification of herd-specific bovine viral diarrhea virus isolates from infected cattle and sheep. Vet Microbiol 43: 283-94.

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

- **PETERHANS, E.; BACHOFEN, C.; STALDER, H.; SCHWEIZER, M.** 2010. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet. Res*: 41-44.

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

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

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

- **QUETALPILLÁN, J.** 2012. Determinación de eficiencia replicativa de aislados chilenos de llamas y alpacas del virus diarrea viral bovino en células MDBK. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 82 pp.

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

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

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

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

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

- **RIDPATH, J.F.** 2003. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, 31: p. 127-31.

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

- **RIDPATH, J.F.** 2010. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet Clin Food Anim* 26: 105121.

- **ROBERT, A.** 2004. Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). *Theriogenology.* 61: p. 117-27.

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

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

- **THABTI, F.; FRONZAROLI, L.; DLISSI, E.; GUIBERT, J-M.; HAMMAMI, S.; PÉPIN, M.; RUSSO, P.** 2002. Experimental model of border disease virus infection in lambs: comparative pathogenicity of *pestiviruses* isolated in France and Tunisia. *Vet. Res.* 33: 35-45.

- **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.

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

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

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