



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

PARENTESCO GENÓMICO DE AISLADOS DE PESTIVIRUS OBTENIDOS DE OVEJAS, CABRAS, ALPACAS Y LLAMAS NATURALMENTE INFECTADAS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE UNA FRACCIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA E2

JORGE LUIS BEAMÍN GUTIÉRREZ

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

NOTA FINAL:

NOTA FIRMA

PROFESOR GUÍA : MARÍA O. CELEDÓN V.

.....

PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ PIZARRO L.

.....

PROFESOR CONSEJERO: SERGIO BUCAREY V.

.....

Esta memoria es parte del proyecto FONDECYT 1080130

SANTIAGO, CHILE
2009

INDICE

RESUMEN	2
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
1. CARACTERÍSTICAS DE LA PRODUCCIÓN OVINA Y CAPRINA CHILENA	6
2. CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS DOMÉSTICOS	10
3. ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR AGENTES INFECCIOSOS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS.....	13
4. GENERALIDADES DE LOS PESTIVIRUS.....	15
5. GENOTIPOS DE LOS PESTIVIRUS.....	17
5.1. GENOTIPO VDVB-1.....	18
5.2. GENOTIPO VDVB-2.....	19
5.3. GENOTIPO VEF.....	20
5.4. GENOTIPO VPPC.....	21
5.5. OTROS POSIBLES GENOTIPOS DE PESTIVIRUS.....	21
6. BIOTIPOS DE LOS PESTIVIRUS.....	22
7. PESTIVIRUS EN BOVINOS.....	22
7.1. VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB).....	22
7.2. PATOGÉNESIS DEL VDVB.....	23
7.3. ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS (EM).....	25
8. PESTIVIRUS EN OVINOS.....	26
8.1. ENFERMEDAD DE LA FRONTERA (EF).....	26
9. PESTIVIRUS EN CAPRINOS.....	28
10. PESTIVIRUS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS.....	29
11. DIAGNÓSTICO DEL VDVB.....	31
12. PRUEBAS DE DETECCIÓN DEL VIRUS	31
12.1. AISLAMIENTO VIRAL (AV) E IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS EN CULTIVO CELULAR	31
12.2. TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA (IPI).....	32
12.3. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES POR PRUEBA DE INMUNOFUORESCENCIA DIRECTA (IFD).....	33
12.4. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES POR PRUEBA INMUNOENZIMÁTICA DE ELISA	34
12.5. DETECCIÓN DEL GENOMA VIRAL POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	35
13. CONTROL DEL VDVB	36
14. SITUACIÓN DEL VDVB EN CHILE	36
HIPÓTESIS DE TRABAJO	40
OBJETIVO GENERAL	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
MUESTRAS	41
CULTIVOS CELULARES	41
REACTIVACIÓN DE AISLADOS DE PESTIVIRUS CONSERVADOS A -40°C	41
PRUEBA DE INMUNOFUORESCENCIA DIRECTA	42
AMPLIFICACIÓN DE UNA FRACCIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA E2	43
EXTRACCIÓN DEL ARN VIRAL	43
TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y AMPLIFICACIÓN POR PCR DE UNA FRACCIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA E2 DEL GENOMA VIRAL.....	43
PURIFICACIÓN DEL ADN AMPLIFICADO POR LA REACCIÓN DE RT-PCR.....	44
SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DEL ADN PURIFICADO.....	45
ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE UNA ZONA DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA E2.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
CONCLUSIÓN	59
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	72

RESUMEN

El género pestivirus pertenece a la familia *Flaviviridae* e incluye a virus que afectan a rumiantes domésticos como bovinos, ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos así como también a rumiantes silvestres y cerdos. En los últimos años, en la literatura internacional, se han descrito cuatro especies de pestivirus: virus de la diarrea viral bovina genotipo 1 y 2 (VDVB-1 y VDVB-2), virus de la enfermedad de la frontera (VEF) y virus de la peste porcina clásica (VPPC). Dentro del género pestivirus, el VDVB es de distribución mundial, produce cuadros clínicos de distinta gravedad y produce grandes pérdidas económicas sobre todo por el daño a nivel reproductivo que causa en el ganado y por la presencia de animales persistentemente infectados los que actúan como reservorio de la enfermedad. Por medio de estudios moleculares, se han determinado varios subgrupos dentro de cada especie viral de pestivirus, así como también, se han propuesto nuevos pestivirus propios de especies silvestres lo que ha incentivado estudios para determinar si pequeños rumiantes y especies silvestres han sufrido contagio desde el ganado bovino vía interespecies, o bien, poseen especies virales propias de pestivirus.

El objetivo de esta memoria de título fue determinar el parentesco genético de aislados de pestivirus obtenidos de ovejas, cabras, alpacas y llamas naturalmente infectadas mediante el análisis de una fracción del gen de la proteína E2. Para esto, se trabajó con 25 aislados de pestivirus, los cuales fueron reactivados por medio de sucesivos pasajes por cultivos celulares y posteriormente confirmados como positivos por prueba de inmunofluorescencia directa. Se realizó extracción del ARN viral de los aislados, para poder realizar la amplificación por RT-PCR, utilizando partidores específicos. Finalmente, se realizó alineamiento de secuencias nucleotídicas y análisis filogenético, el que incluyó cepas de referencia internacionales y secuencias de aislados de bovinos chilenos.

El análisis por filogenia molecular determinó que del total de 25 aislados analizados, 21 (84%) corresponden al subgrupo VDVB-1e. Los 4 aislados restantes (16%) fueron clasificados dentro del subgrupo VDVB-1b. Esto permite concluir que en pequeños rumiantes en Chile se encuentran presentes los subgrupos 1b y 1e del VDVB, estrechamente relacionados genéticamente con los aislados bovinos nacionales.

SUMMARY

The genus *Pestivirus* belongs to *Flaviviridae* family and includes viruses that affect domestic ruminants such as bovines, ovines, caprines, South American camelids as well as pigs and wild ruminants. Four species has been described so far: bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1 and 2 (BVDV-1 and BVDV-2), border disease virus (BDV) and classical swine fever virus (CSFV). BVDV is distributed worldwide causing clinical signs of different severities and important economic losses, most of them due to reproductive disorders and presence of persistently infected animals acting as disease reservoir. Molecular studies have determined several subtypes within pestiviruses, and it has been proposed putative novel pestiviruses in wildlife animals. Several studies has been performed in order to determine whether little ruminants and wildlife animals are infected from cattle by interspecies spread or they have their own *pestivirus* species.

The aim of this study was to determine genotypes and subgroups of viruses obtained from sheep, goats, alpacas and llamas naturally infected with pestiviruses by phylogenetic analysis of glycoprotein E2 gene. Twenty five pestivirus isolates were isolated by successive cell cultures passages and identified by direct immunofluorescence (DIF). RNA was extracted, amplified by RT-PCR, and sequenced. Multiple pairwise alignments of nucleotide sequences and phylogenetic analysis was made including reference sequences obtained from the GenBank data library, and Chilean bovine sequences.

The phylogenetic analysis determined that of 25 isolates, 21 (84%) segregated as BVDV-1e, and four (16%) as BVDV-1b. It is concluded that pestiviruses infecting little ruminants in Chile belong to BVDV 1b and 1e and they are closely related to pestiviruses found in Chilean cattle.

INTRODUCCIÓN

Los pequeños rumiantes domésticos, ovinos, caprinos, alpacas y llamas, distribuidos en el territorio chileno, en muchos casos, son la única fuente de sustento para sectores poblacionales de menores recursos económicos. En la actualidad, adquieren mayor importancia debido a que se está estimulando su producción, con la finalidad de mejorar la calidad de vida de sus propietarios y, para lograr una máxima eficiencia productiva es fundamental considerar la sanidad de los animales.

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB), un pestivirus de distribución mundial, es el agente causal del complejo diarrea viral bovina/enfermedad de las mucosas DVV/EM el cual produce pérdidas económicas significativas en el ganado bovino ya que está relacionado con enfermedades que comprometen los órganos de la reproducción, además de otros tejidos. Este mismo agente y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) del ovino, también un pestivirus, tienen capacidad de producir enfermedades, similares a las producidas en el bovino, en ovinos y caprinos, pero su rol patógeno en otros rumiantes domésticos y silvestres es discutido. Las dos especies virales y en especial el VDVB, presentan alta variabilidad genómica debido a su alta tasa de mutación, que se expresa en variabilidad antigénica, diferencias en su patogenicidad y diferentes grados de virulencia.

Genómicamente el VDVB, el pestivirus más estudiado, se clasifica en dos genotipos, VDVB genotipo 1 (VDVB-1) y VDVB genotipo 2 (VDVB-2), y en varios subgrupos dentro de cada genotipo. En la actualidad, en muchos países se está intentando obtener mayor información sobre la epidemiología de la infección, así como sobre el comportamiento genómico, patogénico y antigénico de pestivirus obtenidos de diferentes especies animales con la finalidad de establecer adecuadas medidas de control.

En Chile, se conoce que el VDVB es endémico de la población bovina con prevalencias serológicas de más de un 60%. Están presentes los dos genotipos y dentro del VDVB-1 los subgrupos 1a, 1b, y 1c. También se ha aislado VDVB-1 desde ovejas y cabras de diferentes regiones del país y VDVB-1 y VDVB-2 desde alpacas y llamas ubicadas en la Región Metropolitana de Santiago, pero, se desconoce las relaciones filogenéticas, a nivel de

subgrupos, que están presentes en estas poblaciones animales, por lo que se hace necesario investigar el parentesco genómico de aislados obtenidos de estas especies animales a fin de contribuir a programas de control de la enfermedad y adoptar las medidas de prevención más adecuadas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. CARACTERÍSTICAS DE LA PRODUCCIÓN OVINA Y CAPRINA CHILENA

En Chile, la producción ovina y caprina, son importantes por el número de animales que representan, por el número de productores que viven de estos animales, por las praderas que ocupan, las que son en gran parte praderas naturales, y por el uso que se le da a su producción. Adicionalmente, la producción ovina es importante por las divisas que generan las exportaciones de sus principales productos, carne y lana, las que en el año 2004 alcanzaron alrededor de 41,5 millones de dólares (ODEPA, 2005).

En general, el sector ovino y caprino nacional se ha caracterizado por ocupar suelos donde la producción de ganado bovino es muy difícil (García, 1998), ubicándose en terrenos marginales donde los niveles productivos de los pastizales son bajos, lo que hace que el sistema de crianza sea extensivo con una baja carga animal por unidad de superficie, lográndose bajos índices reproductivos y productivos, lo que se traduce, generalmente, en una baja rentabilidad.

La producción de carne ovina es claramente estacional, dado que la gran mayoría de los animales ocupa praderas naturales, caracterizadas por un ciclo corto de vida. En la zona central de Chile los corderos son producidos en septiembre, en donde se logran los mayores precios; en la zona sur, en cambio, el mayor beneficio corresponde al mes de diciembre. En la zona austral, los corderos se producen de enero a marzo, exportándose la gran mayoría de ellos con un peso de canal inferior a los 11 kilos (Pérez, 2005).

En el caso de la producción de carne caprina, resulta difícil hacer un análisis de este mercado pues es mayoritariamente informal, como se puede apreciar en las cifras de animales sacrificados, las que deben estar por debajo de lo que ocurre en la realidad de este mercado.

La producción ovina en Chile se concentra principalmente en la XI Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo y XII Región de Magallanes y de la Antártica Chilena donde se encuentra aproximadamente el 63% de la masa total de ovinos del país (2.450.000 cabezas aprox.) (INE, 2007*b*), lo que muestra una clara distribución regional de estos animales (Cuadro 1). En estas regiones, predomina ampliamente la raza Corriedale. Entre

la IV Región de Coquimbo y X Región de Los Lagos, se ubica la mayor parte del resto de la masa ovina, constituida principalmente por rebaños pequeños (entre 15 y 60 ovinos) a medianos (sobre 60 ovinos). Estos rebaños están en manos de pequeños y medianos productores, presentando en su mayoría una baja viabilidad económica y están provocando una acelerada degradación del medio ambiente, por sobreexplotación de praderas y arbustos (Pérez, 2005). Estos pequeños y medianos productores tienen como una de sus principales actividades la producción de carne, la que a nivel de la población nacional presenta un consumo, de 0,5 a 0,3 kg. por habitante al año, sin considerar la venta informal de carne ovina (ODEPA, 2005).

CUADRO 1. Existencia de ganado ovino según regiones

Región	Informantes	Cabezas
Total país	76.218	3.889.319
I Región de Tarapacá	467	10.104
II Región de Antofagasta	598	10.588
III Región de Atacama	319	5.232
IV Región de Coquimbo	3.100	84.215
V Región de Valparaíso	712	30.485
VI Región del Libertador General Bernardo O'Higgins	2.599	157.648
VII Región del Maule	4.112	155.129
VIII Región del Bío-Bío	11.120	173.735
IX Región de La Araucanía	22.413	277.884
X Región de Los Lagos	18.873	315.198
XI Región Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo	1.538	304.936
XII Región de Magallanes y la Antártica Chilena	544	2.205.270
Región Metropolitana de Santiago	822	24.517
XIV Región de Los Ríos	8.509	116.149
XV Región de Arica y Parinacota	492	18.229

Fuente: INE, 2007a

La información proporcionada por el VI Censo Nacional Agropecuario (año 1997) confirmó una significativa reducción de las existencias ovinas, desde 5,7 millones de cabezas en el año 1976 (V Censo) a sólo 3,7 millones en 1997 (VI Censo), lo que implica una variación negativa de un 35%. Se estima que dicho inventario se habría recuperado al año 2007 a una dotación de unos 4 millones de cabezas.

Entre los años 2001 y 2005 el beneficio de cabezas de ganado ovino demostró disminuciones entre el 1 y 6%. En el 2006 esta situación se revierte teniendo un aumento cercano al 17%. Durante el primer semestre de 2007, el beneficio de carne ovina muestra un leve incremento en relación al año anterior, de un 1,7%. En cambio, su producción de carne en vara experimentó una baja de un 6,9% (INE, 2007*b*).

En el cuadro 2 se presenta las existencias de caprinos, según distribución geográfica. Al igual que en los ovinos la distribución es claramente regional. Los caprinos se ubican en mayor proporción en la IV Región de Coquimbo alcanzando un 57,3% de las existencias. Durante el primer semestre de 2007 también redujeron su beneficio en un 40,6% y su producción de carne en vara en un 30,8% (INE, 2007*b*).

CUADRO 2. Existencias de ganado caprino según regiones

Región	Informantes	Cabezas
Total país	17.088	705.800
I Región de Tarapacá	160	2.327
II Región de Antofagasta	355	6.181
III Región de Atacama	557	39.187
IV Región de Coquimbo	5.391	404.562
V Región de Valparaíso	764	45.588
VI Región del Libertador General Bernardo O'Higgins	712	18.573
VII Región del Maule	1.050	40.122
VIII Región del Bío-Bío	3.009	47.319
IX Región de La Araucanía	2.340	50.810
X Región de Los Lagos	1.018	11.140
XI Región de Aisén del General Carlos Ibáñez del Campo	310	12.138
XII Región de Magallanes y de la Antártica Chilena	17	158
Región Metropolitana de Santiago	355	12.325
XIV Región de Los Ríos	801	9.328
XV Región de Arica y Parinacota	249	6.042

Fuente: INE, 2007*a*

Los propietarios de los ovinos y caprinos que existen en Chile son de diferente índole (Cuadro 3). En el caso de los ovinos un 22,2% corresponden a grandes productores y un 43,6% a productores de tamaño medio. En el caso de los caprinos la propiedad, en gran parte, está en manos de pequeños productores (49,7%) y en un 12,8% pertenece a una ganadería de

subsistencia; el resto corresponde a medianos y grandes productores o a crianzas domésticas sin fines productivos.

CUADRO 3. Tipo de productor según tamaño de predio

Tipo de productor	Ovinos	Caprinos
Total	3.710.459	1.253.574
Subsistencia (%)	6,1	12,8
Pequeño (%)	26,9	49,7
Mediano (%)	43,6	6,4
Grande (%)	22,2	14,0
Sin Actividad (%)	1,2	17,1
Total (%)	100,0	100,0

Fuente: ODEPA, 2000.

Respecto a las razas ovinas presentes en Chile, se puede afirmar que, mayoritariamente, corresponden a animales doble propósito (productores de lana y carne) como Corriedale, Hampshire, Romney Marsh, Suffolk y Merino Precoz. Según apreciación de García (1998) y considerando las cifras del censo publicado en 1997, las mayores existencias corresponderían al ganado Corriedale que estaría en un porcentaje de 63,4%, Hampshire en un 10%, Romney Marsh en un 9,7%, Suffolk en un 8,8%, Merino Precoz en un 5,3%, Merino Australiano en un 1,8% y otras razas estarían en un 1%. En los últimos años se ha buscado diversificar la producción ovina nacional, con la importación de razas especializadas en producción de leche como las Latxa, Milchschaaf y Assaf o en producción de carne como la Texel (Pérez, 2005).

En el caso de los caprinos la situación es algo distinta, pues el 80% de la masa estaría constituido por ganado criollo, el 20 % restante está representado por la introducción al país de ganado especializado en la producción de leche como las razas Alpinas, Saanen, Toggenburg y Anglo Nubia; y en el caso de la producción de pelo con las razas Angora y Cachemira. En los últimos años se ha introducido la raza Boer para mejorar la producción de carne caprina (Pérez, 2005).

2. CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS DOMÉSTICOS

Los camélidos sudamericanos domésticos (CSD) son una riqueza pecuaria y genética de las poblaciones andinas. Bajo este término se incluyen dos especies, la alpaca (*Lama pacos*) y la llama (*Lama glama*), destacándose su eficiencia en el uso de la tierra en un ambiente adverso como son las frágiles praderas de los páramos andinos de los cinco países donde se concentra la mayor población natural de estas especies: Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador y Perú (FAO, 2005).

En Chile los camélidos sudamericanos representan sólo el uno por ciento del total de la masa ganadera del país, sin embargo, representan más del 60% de la masa total de animales beneficiados en los mataderos de Arica (FAO, 2005) que sirve a las Regiones de Arica y Parinacota y de Tarapacá. Son el medio de subsistencia de la población Aymara que habita en el altiplano andino sobre la cota de los 3.800 a 4.000 m.s.n.m., y difícilmente podrán ser reemplazados por otras especies animales domésticas, las que habitualmente no se aclimatan, ni menos se adaptan a las extremas condiciones del altiplano. La única especie que ha mostrado una aclimatación al ambiente de la puna es el ovino, aunque con un grado de eficiencia productivo bajo respecto de lo observado para la especie en otras regiones del país. Se estima que el 90% de las alpacas y la totalidad de las llamas de las zonas altiplánicas se encuentra en manos de pequeños productores Aymara, y ellas son indispensables para su subsistencia por que son el principal aporte de proteínas en la dieta, sirven como medio de carga y de transporte, su fibra se emplea en la comercialización y para confeccionar vestimentas, los excrementos son utilizados como combustible y fertilizante y, además, son de gran valor para los rituales religiosos y forman parte del paisaje fomentando el ecoturismo.

Respecto a la distribución de los CSD en Chile, en el Cuadro 4 se observa que el mayor número de animales se encuentra en la Región de Arica y Parinacota y en la Región de Tarapacá concentrando el 80% del total de alpacas y un 82% de las llamas.

Existen dos razas de alpacas, la raza Huacaya y la raza Suri. La raza Huacaya es más abundante a pesar de no existir selección a su favor. Es más rústica que la raza Suri y tiene mayor resistencia al medio, estando bien adaptadas al clima frío. Las crías son robustas y nacen

con abundante lana. El vellón es de apariencia esponjosa y las fibras se alzan casi perpendicularmente al cuerpo. Las alpacas de la raza Suri se encuentran casi exclusivamente en Perú, en general esta raza presenta mayor incidencia de mortalidad y necesita climas más benignos que la Huacaya. La raza Huacaya tiene un promedio de vida de 11 años, aunque no es poco frecuente ver animales de 16-18 años en plena producción y fecundidad o machos en pleno servicio (Bonacic, 1991).

Con respecto a las llamas, existen dos razas, una es la raza Kcara Khala o pelada la que se caracteriza por estar desprovista de fibra o pelo en la cara, cuello, extremidades y barriga, siendo su vellón muy poco denso. Esta raza también denominada Cara-sullo o pelada, se caracteriza por ser un animal de carga y produce escasa cantidad de lana gruesa. La otra raza denominada Chacku, choco, tampulli o lanuda, se caracteriza por tener todo el cuerpo cubierto con pelaje, su vellón es muy denso. También denominada Tapa, esta raza es de menor resistencia para labores de carga, posee una buena producción de lana la que se caracteriza por ser más larga y fina que la anterior (Bonacic, 1991).

La explotación comercial de los camélidos se ha limitado a estas especies domésticas y en los últimos 150 años ha estado en manos de pocos productores e intermediarios que controlan la producción.

CUADRO 4. Existencia de ganado camélido en las explotaciones agropecuarias y forestales por especie, según región

	Alpacas		Llamas	
	Informantes	Cabezas	Informantes	Cabezas
Total país	916	28.741	1.389	50.192
I Región de Tarapacá	168	3.488	484	23.711
II Región de Antofagasta	45	244	203	5.648
III Región de Atacama	5	34	8	47
IV Región de Coquimbo	22	150	35	236
V Región de Valparaíso	37	653	51	382
VI Región del Libertador General Bernardo O'Higgins	67	888	24	138
VII Región del Maule	61	953	18	143
VIII Región del Bío-Bío	42	129	46	252
IX Región de La Araucanía	70	577	100	717
X Región de Los Lagos	49	597	82	503
XI Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo	37	208	2	37
XII Región de Magallanes y de la Antártica Chilena	20	887	13	373
Región Metropolitana de Santiago	25	329	41	188
XIV Región de Los Ríos	44	538	53	425
XV Región de Arica y Parinacota	224	19.066	229	17.392

Fuente: INE, 2007a

La crianza de alpacas y llamas es una actividad económica relevante para las regiones andinas, destacando la producción de fibra, fundamentalmente de alpaca que posee una alta valoración en los mercados internacionales por su fina textura. Este mercado de la fibra siempre ha sido inestable, con amplias fluctuaciones de precio y volúmenes de producción. Muy poco se ha hecho con relación a las tecnologías de producción y al mejoramiento del pelo. La mayor parte de los avances se han realizado en el procesamiento textil y en las tecnologías de tratamiento del pelo.

La carne, en forma contraria, tanto de llama como de alpaca, posee un consumo bajísimo en los medios urbanos, pese a sus extraordinarias cualidades nutritivas, como lo son el bajo porcentaje de grasa y un nivel de proteína más alto en relación a otras especies, características adecuadas para los perfiles nutricionales de las sociedades modernas. Sin embargo, esta carne se considera como un producto de baja calidad, principalmente por la presencia de parásitos, como sarcosporidios, que altera las características organolépticas del producto. Se suma a ello el hecho de que se considera a la carne de camélidos como alimento único de campesinos y no para las poblaciones urbanas debido a su idiosincrasia (FAO, 2005).

La explotación comercial de los camélidos en Chile tiene el potencial de convertirse en un negocio rentable con muchos beneficios para el sector agrícola, así como de las personas que actualmente dependen de estos animales para su sustento. Es factible pensar en alcanzar niveles de éxito similares a los obtenidos en otros países, considerando además la excelente condición sanitaria de Chile y la posibilidad de aplicar modernas tecnologías científicas y de manejo.

En Chile, de acuerdo al último censo agropecuario nacional, la población de camélidos sudamericanos está creciendo, y además se está expandiendo, por la transferencia a modo experimental de rebaños a otras zonas de crianza, como la zona central y sur del país. Para este objetivo resulta relevante fomentar la incorporación de prácticas de manejo en diferentes ámbitos tales como alimentación, reproducción y sanidad, tanto en su ambiente natural como en los ambientes donde ellos son introducidos. Al respecto, la prevención y control de las enfermedades infecciosas es un factor fundamental a considerar para la adecuada producción de CSD (Parreño y Marcoppido, 2006).

3. ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR AGENTES INFECCIOSOS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Los CSD son animales más bien saludables, deben confluír notables condiciones de infección para ser capaces de producir un cuadro clínico en estas especies (Thedford y Johnson, 1989).

En general, se señala que la adquisición de infecciones de los camélidos se debe a contagio interespecies (Evermann, 2006). Los camélidos poseen una relación filogenética cercana con los rumiantes, sin embargo, no son afectados por todas las enfermedades que ellos presentan, de hecho dentro de los propios rumiantes las especies no comparten, en su totalidad, las mismas enfermedades. No obstante, se asume que los CSD son susceptibles al común de las enfermedades padecidas por rumiantes (Rivera *et al.*, 1987) y a algunas que afectan a los équidos como la influenza equina y la infección con el virus herpes equino 1 (Parreño y Marcoppido, 2006).

De las enfermedades bacterianas más comunes que afectan a los CSD se describe la enterotoxemia que es una de las enfermedades de mayor impacto sanitario y económico en los productores de camélidos sudamericanos, afectando principalmente a las crías con altas tasas de morbi-mortalidad (Parreño y Marcoppido, 2006). Es causada por *Clostridium perfringens* tipo A, C y D, siendo el tipo A el de mayor importancia epidemiológica (Ramírez, 1987; Ramírez, 1991). El edema maligno y el tétanos se presentan como complicaciones de heridas (nunca de manera espontánea) (Ramírez, 1991; Fowler, 1994; Solis Hospinal, 2000).

Otra enfermedad bacteriana descrita en camélidos sudamericanos es la colibacilosis. Es producida por *Escherichia coli* (*E. coli*). En etapas neonatales produce infección principalmente los primeros 2 meses de vida (Ramírez, 1991). Los serogrupos asociados a diarrea por *E. coli* enteropatógena en alpacas son O136, O78 y O8/O60/OX2B (Parreño y Marcoppido, 2006). En camélidos adultos, representan la causa mas común de infecciones uterinas, mastitis y abscesos (Fowler, 1994). También se ha reportado un caso de meningoencefalitis con abscedación del cerebro en una cría de alpaca, insuficientemente calostrada (Tsur *et al.*, 1996). También se han descrito infecciones mixtas de *E. coli* con otros agentes infecciosos como *Salmonella* y rotavirus (Parreño *et al.*, 2001).

El género *Salmonella sp.* produce diarrea severa y afecciones respiratorias principalmente en crías de camélidos (Parreño y Marcoppido, 2006). En camélidos se ha identificado *Salmonella cholerasuis* var *kunzendorf* y *Salmonella typhimurium*.

Las afecciones respiratorias agudas son frecuentes en las crías de camélidos (Parreño y Marcoppido, 2006). Los agentes bacterianos aislados de estos cuadros son *Pasteurella multócida*, (Fowler, 1994; Solís Hospinal, 2000) y *Pasteurella haemolytica* (Ramírez, 1991). En camélidos adultos podría estar involucrado el *Mycoplasma* (Hung *et al.*, 1988). *Staphylococcus aureus* o *sp.* y *Streptococcus sp.* (hemolítico) han sido aislados de procesos neumónicos en crías de alpacas en Perú (Barsallo, 1985).

Dentro de las enfermedades sistémicas, se han registrado casos de ántrax en camélidos (Parreño y Marcoppido, 2006). Cinco agentes de tuberculosis, *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. microti* y *M. kansaii*), han sido aislados en camélidos (Thedford y Johnson, 1989; Fowler, 1994).

Otras enfermedades bacterianas que pueden afectar a camélidos son brucelosis, listeriosis, paratuberculosis, leptospirosis, actinomycosis, rodococosis y fiebre de la alpaca producida por *Streptococcus zooepidermicus* (Parreño y Marcoppido, 2006).

Dentro de las infecciones virales más importantes que afectan a camélidos se encuentran aquellas que producen enfermedad generalizada como la fiebre aftosa, el ectima contagioso, y existen evidencias serológicas de exposición al virus de la lengua azul. La rabia produce alteraciones a nivel del sistema nervioso. De los que producen enfermedades respiratorias podemos mencionar virus parainfluenza 3 que causa neumonía aguda, el virus respiratorio sincicial bovino, influenza A y adenovirus que produce bronconeumonía. Además, se describen virus que producen diarreas neonatales dentro de los que se cuenta rotavirus y coronavirus.

Existe además un grupo de virus que produce enfermedades de tipo respiratoria y reproductiva. En este grupo es posible mencionar al virus herpes bovino 1, al recientemente descrito virus herpes equino tipo 1 causante de la ceguera neuropática y al virus de la diarrea viral bovina agente causal de diarrea, descarga nasal, muerte súbita y abortos en camélidos.

Es importante destacar que los camélidos sudamericanos podrían actuar como reservorios de agentes asociados a enfermedades zoonóticas, como por ejemplo tuberculosis, brucelosis, leptospirosis, y síndrome urémico-hemolítico. Por este motivo, el monitoreo de los rebaños domésticos y de las poblaciones silvestres de camélidos resulta importante a la hora de estudiar la epidemiología de las infecciones antropozoonóticas así como también, las enfermedades interespecie que resultan del contagio con ganado doméstico (Parreño y Marcoppido, 2006), de tal modo que, se debe tener especial cuidado con el contacto con animales no fiscalizados ya que se pone en peligro el patrimonio zoonosanitario de nuestro país (FAO, 2005).

De especial relevancia sería prestar atención a la infección con pestivirus en los CSA, debido a que este agente es considerado como el que produce las mayores pérdidas productivas y reproductivas en el ganado (Vilček *et al.*, 2004).

4. GENERALIDADES DE LOS PESTIVIRUS

El género *Pestivirus*, perteneciente a la familia *Flaviviridae* incluye a virus que afectan a rumiantes y a especies relacionadas dentro del orden Artiodactyla (Nettleton, 1990; Becher *et al.*, 1997; Ávalos Ramírez *et al.*, 2001; Evemann y Barrington, 2005). Dentro de los rumiantes, las especies afectadas incluyen animales domésticos y silvestres en cautiverio y en vida silvestre (Løken, 2000). Contiene tres especies virales antigénicamente relacionadas: los virus de la diarrea viral bovina genotipo 1 (VDVB-1), y genotipo 2 (VDVB-2), que infectan principalmente a bovinos, ovinos y caprinos; el virus de la enfermedad de la frontera (VEF), que infecta a ovinos y caprinos (Vilček *et al.*, 1997); y el virus de la peste porcina clásica (PPC) que infecta a porcinos (Murphy *et al.*, 1999).

Los pestivirus se caracterizan porque sus viriones miden 40 a 60 nm de diámetro (Lindenbach *et al.*, 2007). El genoma consiste en una hebra única de ARN de polaridad positiva constituido por alrededor de 12,3 kilobases, donde se ubica un marco de lectura abierto "ORF" (del inglés "Open Reading Frame") para una poliproteína de alrededor de 4.000 aminoácidos. En los extremos 5' y 3' existen regiones que no codifican para proteínas, llamadas "UTR" (del

inglés Untranslated Region) de alrededor de 372-385 y 185 a 273 nucleótidos, respectivamente (Murphy *et al.*, 1995; Vilček *et al.*, 1997; Lindenbach *et al.*, 2007). La poliproteína dará origen a las proteínas estructurales y no estructurales; procesamiento mediado por proteasas virales y celulares (Lindenbach *et al.*, 2007).

La distribución de los genes dentro del ORF de la poliproteína en la cepa NADL de VDVB sigue el siguiente orden en sentido 5'-3': NH₂-N^{pro}-C-E^{rns}-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (Collett *et al.*, 1988*b*; Lindenbach *et al.*, 2007) (Figura 1).

El inicio de la traducción del genoma de los pestivirus es de tipo Cap-independiente y es mediado por una secuencia nucleotídica conocida como IRES (del inglés, Internal Ribosome Entry Site) (Giangaspero y Harasawa, 2004; Lindenbach *et al.*, 2007) lo que le permite comenzar la traducción del RNA mensajero a pesar de carecer de modificación Cap en su extremo 5'.

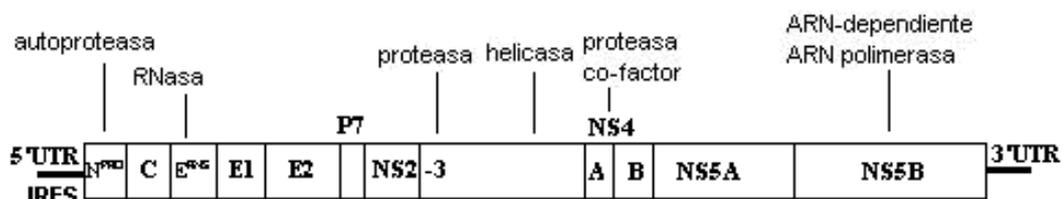


FIGURA 1. Proteínas estructurales y no estructurales obtenidas por el procesamiento de la poliproteína de la cepa NADL del VDVB.

La primera proteína codificada por el virus es N^{pro}, (cuya abreviación se refiere a "N-terminal autoprotease") (Becher *et al.*, 1999), corresponde a una proteasa no estructural, propia de los pestivirus, con actividad autocatalítica que precede a la región que codifica para las proteínas estructurales del virus, la que corresponde a 1/3 de la poliproteína. Los 2/3 restantes de la poliproteína corresponden a las proteínas no estructurales del virus.

En cuanto a las proteínas estructurales, la nucleocápside está constituida por una única proteína, la proteína C, que se repite múltiples veces. Rodea a la cápside una envoltura lipídica en la que se insertan 3 glicoproteínas: E^{rns}, E1, E2 (Thiel *et al.*, 1996). E^{rns} (cuya abreviación se refiere a "ribonucleasa soluble") (Becher *et al.*, 1999), es una glicoproteína de envoltura

altamente glicosilada con actividad ribonucleasa indispensable para el ciclo infeccioso viral, que induce la producción de niveles significativos de anticuerpos en el animal, pero con una muy limitada actividad neutralizante. E1, otra glicoproteína de la envoltura, en el virión se encuentra covalentemente unida a E2 pero la inducción de anticuerpos neutralizantes es pobre. E2 es la proteína mayoritaria de la partícula viral y juega un rol preponderante en la respuesta inmune del hospedero, ya que posee los epítopes críticos en la estimulación de la producción de anticuerpos neutralizantes (Xue *et al.*, 1990; Horzineck, 1990; Boulanger *et al.*, 1992; Goens, 2002; Lindenbach *et al.*, 2007). La proteína E2 en VDVb-1 tiene un epítipo inmunodominante y en VDVb-2 tiene tres epítipes inmunodominantes (Chase *et al.*, 2004). p7 es la proteína que sigue a las proteínas estructurales del virión. No está claro si es una proteína estructural o no estructural. Esta proteína puede formar canales de iones por lo que podría tener función en el ensamblaje y entrada del virus (Lindenbach *et al.*, 2007).

Las proteínas no estructurales se encuentran formadas por NS2-3 (NS2, NS3), NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Thiel *et al.*, 1996). Estas proteínas poseen diferentes actividades. La proteína NS2-3, en algunas cepas de pestivirus es cortada dando lugar a las proteínas NS2 y NS3 (Collett *et al.*, 1988b), lo cual se utiliza como indicador de citopatogenicidad para el VDVb. La proteína NS2 ha sido descrita recientemente como una cisteína proteasa (Lindenbach *et al.*, 2007). Aparentemente, la proteína NS3 tendría actividad de serina proteasa (Méndez *et al.*, 1998), NTPasa y helicasa (Grassmann *et al.*, 1999). Luego de NS2-3, están las proteínas no estructurales NS4 y NS5, las que son procesadas generando NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. NS4A actúa como cofactor para la serina proteasa NS3 (Lindenbach *et al.*, 2007). Poco se sabe sobre la función de las demás proteínas y se postula que NS5B sería la polimerasa ARN-dependiente del virus (Meyers y Thiel, 1996; Lindenbach *et al.*, 2007).

5. GENOTIPOS DE LOS PESTIVIRUS

La amplificación del genoma, por PCR, y secuenciación de diferentes segmentos del genoma viral, tales como secciones de la región 5'UTR (Ridpath *et al.*, 1994; Vilček *et al.*, 2001), del gen completo que codifica para N^{pro} (Becher *et al.*, 1997; Vilček *et al.*, 2001), y del

gen que codifica para E2 (Becher *et al.*, 1999; Tajima *et al.*, 2001), seguido por análisis filogenético, permite agrupar, basado en la homología de la secuencia de ácidos nucleicos, las variantes genéticas de cepas y aislados de campo de pestivirus en diferentes ramas de árboles filogenéticos (Sakoda *et al.*, 1999; Ridpath, 2003). Esto ha permitido clasificar al VDVB en dos genotipos, VDVB-1 y VDVB-2 (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Ridpath y Bolin, 1998) y diferenciar claramente los VDVB, VEF y VPPC. Del mismo modo, es posible además, clasificar estas especies de pestivirus en subgrupos (Becher *et al.*, 1997; Becher *et al.*, 1999; Paton *et al.*, 2000; Vilček *et al.*, 2001; Beer *et al.*, 2002; Hurtado *et al.*, 2004). El análisis filogenético de porciones conservadas del genoma como 5' UTR y N^{pro} resulta en la formación de menos ramas dentro de una especie viral con respecto a si se analizan regiones menos conservadas, como es el caso de E2 (Ridpath, 2003).

Los estudios de variabilidad genética han permitido determinar que la homología de secuencias nucleotídicas de la región 5'UTR entre 2 virus de distintos genotipos bordea el 75%, en cambio la homología de virus pertenecientes a un mismo genotipo, sube a un 90% en el caso del VDVB-1 y 96% en el caso de VDVB-2 (Ridpath *et al.*, 1994; Pellerin *et al.*, 1994; Vilček *et al.*, 2001).

5.1. GENOTIPO VDVB-1

El genotipo VDVB-1 es de distribución mundial y representa más de la mitad de todos los aislados genotipificados reportados hasta el momento. A este genotipo pertenecen, por ejemplo, las cepas de referencia NADL, Singer, Oregon y Osloss. Son reconocidos, en general, por producir cuadros clínicos leves cuando infectan animales en vida extrauterina.

Los primeros análisis del genoma, efectuados en secciones de la región 5' UTR, permitieron clasificar el VDVB-1 en dos subgrupos: 1a y 1b (Pellerin *et al.*, 1994). Posteriormente, el análisis de diferentes aislados, en la región 5' UTR y en N^{pro}, indican que existen al menos 11 subgrupos de VDVB-1: VDVB-1a hasta VDVB-1k (Vilček *et al.*, 2001; Vilček *et al.*, 2004). Posteriormente, se han descrito VDVB-1l, DVB-1m en aislados de Francia (Jackova *et al.*, 2008), VDVB-1n y VDVB-1o en aislados de Japón (Nagai *et al.*, 2008), pero, estos

subgrupos aún no están aceptados por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, sin embargo, son ampliamente citados en estudios de epidemiología molecular (Tajima *et al.*, 2001; Jackova *et al.*, 2008).

Dentro del VDVB-1 existen algunos subgrupos más difundidos como es el caso de 1a y 1b, presentes en toda América y en varios países de Europa, Asia y África (Evermann y Ridpath, 2002). La mayor diversidad en cuanto a subgrupos se encuentra en Europa donde países como Austria, Alemania, Italia y Eslovenia presentan aproximadamente 4 subgrupos de VDVB-1 circulando en su ganado: VDVB-1a, 1b, 1d y 1f (Vilček *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2001; Falcone *et al.*, 2003; Toplak *et al.*, 2004).

Poco se sabe con respecto a la variabilidad genética del VDVB-1, basada en el análisis de E2, en relación al tiempo y a la ubicación geográfica. Actualmente, se describen siete subgrupos, desde VDVB-1a al VDVB-1g (Tajima *et al.*, 2001; Tajima, 2004).

5.2. GENOTIPO VDVB-2

Este genotipo fue descrito por primera vez en 1994, cuando se analizaron aislados asociados a brotes de un síndrome hemorrágico y trombocitopenia que causó grandes pérdidas económicas en Estados Unidos de Norteamérica y en el oeste de Canadá (Pellerin *et al.*, 1994., Ridpath *et al.*, 1994). Pellerin *et al.*, (1994) realizaron la caracterización de los 2 últimos tercios de la región 5' UTR del genoma de los nuevos aislados y compararon las secuencias de nucleótidos con las secuencias de cepas clásicas de VDVB-1a y 1b. El porcentaje de homología entre las cepas de referencias y los nuevos aislados no superó el 75%. Junto con estudios de neutralización viral demostraron que se trataba de un nuevo genotipo viral, que se denominó genotipo VDVB-2.

Posteriormente, se ha reportado presencia del VDVB-2 en forma esporádica en Europa y en Japón (Ridpath *et al.*, 1994; Pellerin *et al.*, 1994; Vilček *et al.*, 1997; Beer *et al.*, 2002; Sakoda *et al.*, 1999). Hasta ahora, se han descrito 2 subgrupos: VDVB-2a y VDVB-2b (Becher *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2002). Trabajos de identificación genómica de aislados ovinos que presentaban signología clínica similar a la ocurrida en animales con enfermedad de la frontera,

ha permitido postular la existencia en ovinos de 4 subgrupos de VDVB-2: VDVB-2a, VDVB-2b, VDVB-2c y VDVB-2d (Giangaspero y Harasawa, 2004).

Con respecto a la presencia del VDVB-2 en Sudamérica, en Argentina, se detectó en brotes de animales con signología de enfermedad aguda hemorrágica en bovinos jóvenes (Odeón *et al.*, 1998). En trabajos posteriores se detectó VDVB-2 en 3 muestras de tejidos fetales y suero de animales cuya fecha de obtención fue de 7 a 8 años previa al brote descrito por Odeón en 1998 (Jones *et al.*, 2001). Además, se describió VDVB-2 en 2 brotes de animales que presentaron signología digestiva y dermatológica con una homología de 88 a 90% con la cepa de referencia 890 (Odeón *et al.*, 2003). En Brasil, se determinó la presencia de VDVB-2 en bovinos jóvenes con enfermedad respiratoria y digestiva además de la presencia en animales sin signología clínica (Flores *et al.*, 2000). Análisis posteriores demostraron la presencia de los subgrupos VDVB-2a y VDVB-2b (Flores *et al.*, 2002). En Chile se encontró el VDVB-2 en 17 aislados pertenecientes a bovinos de diferentes predios. Estos aislados se consideraron como cepas avirulentas del VDVB-2 ya que no se estableció una relación entre los signos clínicos agudos descritos en Norte América (Pellerin *et al.*, 1994., Ridpath *et al.*, 1994) y la especie viral encontrada (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

5.3. GENOTIPO VEF

Dentro de la especie VEF se describen varios genotipos provenientes de aislados europeos, norteamericanos y en menor cantidad africanos (Vilček *et al.*, 1997; Becher *et al.*, 2003; Thabti *et al.*, 2005). Las comparaciones de secuencias de aislados VEF con aislados de referencia de otras especies dentro del género pestivirus definen tres grupos, uno filogenéticamente más cercano al VPPC, uno más similar a VDVB y uno compuesto por aislados distintos a los dos grupos anteriores (Sullivan *et al.*, 1997).

Aunque, genéticamente estos genotipos podrían considerarse como especies distintas, debido a los porcentajes de homología entre ellos, antigénicamente se encuentran más relacionados entre sí que entre las diferentes especies de pestivirus. De esta forma, se describen tres genotipos dentro de la especie VEF y se denominan VEF-1, VEF-2 y VEF-3 obtenidos de oveja (Becher *et al.*, 2003). Últimamente, se postuló un cuarto genotipo de VEF

proveniente de aislados de la región de Túnez. Las distancias filogenéticas entre los aislados tunecinos y los aislados correspondientes a pestivirus descritos hasta el año 2003, indicarían que corresponden a un nuevo grupo más cercano a los VEF que al resto de los pestivirus (Thabti *et al.*, 2005). Estudios realizados en España concluyeron que los pestivirus que afectan a ovinos en esa región corresponden a VEF (Valdazo-González *et al.*, 2006). Posteriormente, se ratificó la presencia de VEF-4 en aislados de ovinos obtenidos en la Península Ibérica los cuales se relacionaban genéticamente con aislados de pestivirus descritos para "Pyrenean chamois" (Valdazo-González *et al.*, 2007). Actualmente, se postula la presencia de VEF-5 y VEF-6 luego de la caracterización genética de aislados de ovinos obtenidos desde Francia (Dubois *et al.*, 2008).

5.4. GENOTIPO VPPC

Hasta el momento se describen 2 genotipos dentro de la especie VPPC. El genotipo 1 está representado por la cepa de referencia Brescia, que agrupa a aislados europeos obtenidos entre los años 40 y 60 y el genotipo 2 representado por la cepa Alfort, donde se encuentran la mayoría de los aislados europeos y asiáticos obtenidos desde la década del 80 (Vilček *et al.*, 1996). Dentro de cada genotipo se encuentran al menos 2 subgrupos. La distancia filogenética en el caso específico de VPPC parece estar relacionada con la zona geográfica de los aislamientos (Stadejek *et al.*, 1997).

5.5. OTROS POSIBLES GENOTIPOS DE PESTIVIRUS

Vilček *et al.*, (2005) señalan que en la naturaleza pueden existir muchos pestivirus que no se ubican dentro de las especies virales mencionadas, ya que aislados obtenidos de especies silvestres y domésticas están poco emparentados con las especies descritas, y es así como se describen los genotipos del reno (*Rangifer tarandus*) (Avalos-Ramírez *et al.*, 2001), el genotipo del bisón (*Bison bonasus*) (Becher *et al.*, 1999), el genotipo VDVB-4 obtenido del ante (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) (Arnal *et al.*, 2004); el genotipo jirafa (*Giraffa camelopardalis*) (Becher *et al.*, 1999; Avalos-Ramírez *et al.*, 2001; Becher *et al.*, 2003) y el genotipo pronghorn obtenido del antílope (*Antilocapra americana*) (Vilček *et al.*, 2005).

6. BIOTIPOS DE LOS PESTIVIRUS

Otra propiedad que caracteriza a los pestivirus es la existencia de dos biotipos, reconocidos por los cambios morfológicos que inducen en los cultivos celulares donde ellos se multiplican. El biotipo no citopático (NCP) está representado por los virus que replican sin producir cambios microscópicamente visibles en las células; en cambio el biotipo citopatogénico (CP), corresponde a aquel que produce cambios morfológicos como vacuolación y muerte de las células infectadas (Thiel *et al.*, 1996; Goens, 2002). En condiciones de campo, la mayoría de los aislados obtenidos corresponden a cepas NCP (Thabti *et al.*, 2002; Saliki y Dubovi, 2004). Es importante destacar que las cepas NCP del VDVB poseen un grado de patogenicidad mayor y son responsables de la mayoría de las manifestaciones clínicas asociadas al VDVB con excepción de la enfermedad de las mucosas que requiere la presencia de ambos biotipos (Saliki y Dubovi, 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). Investigadores han determinado que las cepas NCP son capaces de infectar una amplia variedad de tejidos como el epitelio del tracto digestivo y respiratorio, células sanguíneas, tejido linfoide, órganos de la reproducción, etc.; mientras que, las cepas CP infectan sólo algunos tipos de tejidos, especialmente tejido linfático del aparato digestivo (Lambot *et al.*, 1998).

7. PESTIVIRUS EN BOVINOS

7.1. VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB)

El VDVB fue aislado por primera vez en EE.UU. en 1946, asociado a epizootias de una enfermedad aguda, caracterizada por lesiones erosivas de la mucosa del tracto digestivo y diarreas (Olafson *et al.*, 1946). En 1946, Olafson la describió como una enfermedad transmisible del ganado con una alta morbilidad y baja mortalidad. El ganado afectado mostró fiebre, diarrea y tos. A esta condición se le llamó "Diarrea Viral Bovina". Siete años después Ramsey y Chivers (1953), reportaron una enfermedad mortal del ganado con baja tasa de morbilidad. Esta enfermedad se caracterizó por producir fiebre, anorexia, letargo, diarrea

profusa con sangre fresca o coagulada, descarga nasal mucopurulenta y deshidratación. La muerte, generalmente, ocurría dentro de las dos semanas después de la aparición de los signos clínicos. *Post-mortem* se encontraron extensas ulceraciones del tracto gastrointestinal. A esta enfermedad se le llamó enfermedad de las mucosas (EM). Años después se descubrió que ambas enfermedades eran causadas por el mismo virus, el VDVB (Thiel *et al.*, 1996).

Por muchos años se ha reconocido al VDVB-1 como un patógeno, principalmente, del tracto digestivo pero también está involucrado en enfermedades del complejo respiratorio del bovino y patologías de la reproducción. Además, juega un rol importante en la presentación de otras patologías infecciosas, debido a su efecto inmunodepresor (Baker, 1987).

Se han descrito formas agudas de la enfermedad, asociadas a menudo con un síndrome hemorrágico (Corapi *et al.*, 1990), producidas por cepas más virulentas de VDVB-2 caracterizada por fiebre, diarrea, trombocitopenia, hemorragias, epistaxis, petequias, equimosis, trastornos respiratorios y altas tasas de aborto y mortalidad (Corapi *et al.*, 1989; Bolin y Ridpath, 1992; Carman *et al.*, 1998). Estas cepas virulentas de VDVB-2 no citopáticas (NCP) han sido aisladas y asociadas a brotes de enfermedad aguda y severa en ganado, principalmente, en Canadá y Estados Unidos de Norteamérica, asociadas a grandes pérdidas económicas (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). Sin embargo, la mayor parte de las infecciones en los terneros ocurre con VDVB-1 y VDVB-2 de baja virulencia, con presentación de enfermedad leve o que pasan clínicamente inadvertidas. No obstante, hoy se considera al VDVB como un patógeno importante para el ganado con un gran impacto económico dado, principalmente, como resultado de la infección intrauterina (Thiel *et al.*, 1996).

7.2. PATOGÉNESIS DEL VDVB

La patogénesis de los síndromes clínicos provocados por el VDVB está determinada por muchos factores, entre los que se incluyen la ocurrencia de viremia en el animal afectado, la habilidad del virus para afectar el sistema inmune e invadir ciertos tejidos, la ocurrencia de infecciones transplacentarias, la inducción de inmunotolerancia en etapa prenatal o inmunocompetencia en etapas postnatales (Radostits y Littlejohns, 1988).

La ruta natural de la infección aguda postnatal es la oronasal y es responsable de la ulceración de las mucosas y siguiente salivación o descarga nasal. El virus puede infectar a un animal inmunocompetente a través de la inhalación o ingestión, por parte de éste, de productos contaminados con saliva, secreciones óculo nasal y uterinas, leche, semen, heces, orina y sangre procedentes de animales infectados con el VDVB (Carr y Carman, 2005). Desde allí, el virus entra en el tejido linfoide que rodea la orofaringe, especialmente las células epiteliales en las criptas tonsilares, donde el antígeno viral es encontrado durante la infección aguda. El virus parece ser capaz de multiplicarse en todas o en la mayoría de las poblaciones de linfocitos, así como también, en células accesorias (Thiel *et al.*, 1996). Otras formas de infección son la administración parenteral de productos biológicos contaminados con el virus (fundamentalmente vacunas), picaduras de insectos hematófagos, el empleo de agujas hipodérmicas contaminadas, la inseminación e implantación de embriones procedentes de animales infectados y por todos los implementos de uso rutinario que estén contaminados y que tomen contacto con las mucosas del animal susceptible (Baker, 1987).

En hembras gestantes, producto de la viremia, el virus puede ser transferido al feto en cualquier período de la gestación. La patología causada al feto dependerá, fundamentalmente, del tiempo de gestación que tenga el feto al momento de la infección (Baker, 1990; Brownlie, 1990). En general, el mayor riesgo para el feto ocurre en la gestación temprana (Radostits y Littlejohns, 1988). Si la infección ocurre antes del día 45 de gestación se producirá reabsorción embrionaria (Rivera, 1993). Si ocurre entre los 50 y 100 días, puede ocurrir muerte fetal seguida por aborto o momificación fetal y la expulsión del feto es frecuentemente semanas o meses después (Rivera, 1993). Si el feto es infectado con un aislado NCP antes del día 125 de gestación y no le produce la muerte, éste reconocerá a los antígenos del virus como antígenos propios, no desarrollará anticuerpos y nacerá un animal persistentemente infectado (PI) el cual será inmunotolerante y desarrollará una viremia persistente apareciendo como un animal clínicamente normal (Radostits y Littlejohns, 1988; Rivera, 1993). Si la infección ocurre entre el día 125 y 180 de gestación, los terneros presentarán defectos congénitos como hipoplasia cerebelar, defectos oculares como atrofia retinal, neuritis óptica, cataratas y microftalmia con displasia retinal (Radostits y Littlejohns, 1988). Una infección con el VDVB puede también dar

lugar a terneros con crecimiento retardado que se manifiesta por debilidad y falta de desarrollo corporal (Rivera, 1993).

El feto bovino adquiere inmunocompetencia alrededor del día 180 de gestación. Sin embargo, es capaz de producir inmunoglobulinas sin especificidad detectable en respuesta contra una infección con VDVB antes de lograr inmunocompetencia contra el virus (Radostits y Littlejohns, 1988). La infección con el VDVB en el último período de gestación puede no causar daño al feto, ya que entonces es inmunocompetente y puede responder con anticuerpos neutralizantes. El ternero entonces, es normal y tiene anticuerpos contra el VDVB al momento de nacer antes que se produzca el consumo de calostro (Radostits y Littlejohns, 1988).

Los anticuerpos que el ternero recibe de la madre a través del calostro y leche se agotan entre los 105 y 230 días de edad, después del cual el incremento del título de anticuerpos puede ser debido a una infección natural o a la vacunación (Rivera, 1993).

7.3. ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS (EM)

Fue descrita por primera vez en 1953 (Ramsey y Chivers, 1953). Es una presentación esporádica de la infección con el VDVB, que generalmente ocurre entre los 6 y los 24 meses de edad. Está caracterizada por producir baja morbilidad y una letalidad cercana al 100% (Thiel *et al.*, 1996; Goens, 2002). Esta manifestación clínica se presenta cuando un animal que se ha infectado en vida intrauterina con el VDVB NCP y está en la condición de PI, se sobreinfecta con una cepa del mismo tipo antigénico pero de biotipo diferente, es decir, CP (Brownlie *et al.*, 1984). Los signos clínicos comprenden pirexia, anorexia, letargia, diarrea profusa con contenido de sangre fresca o coagulada, descarga nasal mucopurulenta y deshidratación. La muerte ocurre, generalmente, después de dos semanas de iniciados los signos clínicos. La lesión más evidente es ulceración extensiva del tracto gastrointestinal (Thiel *et al.*, 1996).

Los hallazgos *post-mortem* incluyen erosiones que abarcan todo el tracto digestivo, comúnmente cavidad oral, esófago, pilares del rumen, omaso, abomaso e intestino. Las papilas ruminales pueden disminuir en tamaño. La porción pilórica del abomaso frecuentemente se

observa edematizada y hemorrágica. El contenido intestinal es oscuro, acuoso y de mal olor. La enteritis catarral puede ser progresiva e incluir hemorragias, erosiones y úlceras de la mucosa intestinal. Las placas de Peyer normalmente se encuentran necróticas y hemorrágicas (Baker, 1987).

8. PESTIVIRUS EN OVINOS

8.1. ENFERMEDAD DE LA FRONTERA (EF).

Hughes *et al.*, 1959, describió una enfermedad de las ovejas que llamó "Border Disease" (BD) porque fue descrita, inicialmente, en la región fronteriza entre Inglaterra y Gales (Nettleton, 1990; Hussin y Woldehiwet, 1994; Thiel *et al.*, 1996). También se conoce como "hairy snaker disease" y "fuzzy-lamb syndrome" (Løken, 2000). Este síndrome en la oveja es producido por un pestivirus y puede ser definido como una infección congénita y teratogénica de importancia económica (Westaway *et al.*, 1985; Løken, 2000). Es de distribución mundial y la tasa de prevalencia en ovejas varía entre un 5 y un 50% dependiendo del país y de las regiones dentro de éste (De Mia *et al.*, 2005). Se define como una afección neurológica de los corderos recién nacidos los cuales presentan temblores musculares, malformaciones esqueléticas, retardo del crecimiento y un vellón anormal con características de pelo (Nettleton, 1991; Hussin y Woldehiwet, 1994). Sin embargo, la infección por este virus se asocia también a un síndrome caracterizado por la presentación de abortos, momificación, corderos mortinatos y el nacimiento de individuos PI, los cuales son la fuente más importante de infección dentro de un rebaño (Nettleton, 1990). Los corderos PI, generalmente, no presentan signología clínica, pero excretan el virus continuamente por la vía respiratoria, digestiva y urinaria (Terpstra, 1981).

La transmisión del virus se produce, principalmente, por contacto de la orofaringe con elementos contaminados con el virus. También es posible la transmisión mecánica a través de inyecciones intramusculares, subcutáneas, endovenosas o vacunaciones con virus no inactivado, contaminadas con pestivirus (Løken *et al.*, 1991; Hussin y Woldehiwet, 1994). El rol del macho en la transmisión de la enfermedad no está demostrado, pero, hay un reporte del

nacimiento de corderos PI después de la inseminación artificial o monta natural con carneros PI (Gardiner y Barlow, 1981).

Cuando la infección se produce en hembras gestantes, o en caso que las hembras estén en condición de PI, el virus infecta la placenta causando placentitis y posteriormente infecta al feto (Gardiner y Barlow, 1981).

Los corderos que se infectan entre los 17 a 80 días de gestación pueden sufrir muerte, momificación y malformaciones (Nettleton, 1990). Los que nacen son generalmente pequeños, débiles y de mala conformación, la espalda es corta y arqueada y la cabeza tiende a ser aguzada, algunos presentan dificultad para pararse y debido a un incremento de los folículos primarios se produce un aumento en la cantidad de pelos largos en el vellón, los que forman un halo, especialmente, sobre el cuello y espalda. Los signos nerviosos se deben a una desmielinización del sistema nervioso central y los más frecuentes son: contracciones musculares de los miembros anteriores y espalda, temblores musculares de la cabeza, orejas y cola, apoyo de la cabeza contra objetos, ceguera, nistagmos y anormalidades de la marcha. Estos signos pueden desaparecer con la edad, pero, muchos mueren antes del destete (Nettleton, 1991; Hussin y Woldehiwet, 1994).

El resultado de la infección del feto durante el período del inicio del desarrollo del sistema inmune (entre los 60 y 80 días de gestación), puede originar el nacimiento de corderos virémicos y PI (Hussin y Woldehiwet, 1994). La infección del feto después del día 80 de gestación genera la producción de anticuerpos, por parte del feto, que neutralizan el virus y nacen corderos normales (Nettleton, 1990).

Las infecciones postnatales agudas de corderos y la de animales adultos, provocan un cuadro clínico inaparente o algunas veces depresión pasajera, fiebre y leucopenia. Los animales afectados desarrollan una respuesta inmune eficiente y después de alrededor de 2 semanas de la aparición de anticuerpos neutralizantes, se termina el período virémico y se elimina el virus (Nettleton, 1990). Sin embargo, se ha descrito un cuadro de leucopenia severa con una mortalidad del 50% de los corderos entre 3 y 5 meses de edad, provocado por un VEF de alta virulencia. Los principales signos clínicos fueron: depresión severa, fiebre y diarrea. El examen

post-mortem reveló hemorragias principalmente en el ciego, colon y nódulos linfáticos mesentéricos (Nettleton, 1990). La enfermedad congénita y la infección persistente en los ovinos pueden ser producidas por biotipos NCP del VEF, del VDVB-1 y del VPPC (Ward, 1971; Snowdon y French, 1975; Parsonson *et al.*, 1979; Barlow *et al.*, 1983; Nettleton *et al.*, 1992).

9. PESTIVIRUS EN CAPRINOS

Hay evidencia serológica de infección por pestivirus en cabras de África, Australia, Europa, Norteamérica y Sudamérica (Løken *et al.*, 1982; Nettleton, 1990; Zaghawa, 1998; Pratelli *et al.*, 1999; Celedón *et al.*, 2001). Sin embargo, existen pocos reportes sobre las lesiones clinicopatológicas tanto de infecciones naturales como experimentales producidas por pestivirus en caprinos (Løken, 2000; Hurtado *et al.*, 2004). No obstante, se ha aislado pestivirus desde fetos abortados (Orr, 1987; Pearson, 1987), de cabritos muertos con enfermedad respiratoria (Frasser *et al.*, 1981), de cabritos con enfermedad similar a EF de las ovejas (Løken *et al.*, 1982) y desde un brote severo de falla reproductiva con infecundidad en 42 cabras, abortos en 53, mortalidad perinatal en 118, que ocurrió cuando se vacunó a 276 hembras, con una vacuna experimental para virus ORF contaminada con pestivirus, (Løken *et al.*, 1991). También se ha detectado cabritos PI (Hurtado *et al.*, 2004), que sólo presentan menor tasa de crecimiento (Løken, 2000).

Las cabras, al igual que las ovejas, se pueden infectar con VDVB-1, VDVB-2 y VEF (Pratelli *et al.*, 2001; Scherer *et al.*, 2001; Swasdipan *et al.*, 2001). Løken, (2000) señala que las rutas de infección pueden ser variadas, pero, la oronasal es la más probable; y que las cabras con infección aguda, generalmente, no transmiten pestivirus a otros animales, pero, las susceptibles han sido fácilmente infectadas en lugares cohabitados por animales PI y también cuando se emplean agujas contaminadas.

10. PESTIVIRUS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

La naturaleza exacta de la infección con pestivirus, en particular del VDVB, es sujeto de una activa investigación especialmente en llamas y alpacas (Evermann, 2006). Pocos reportes existen sobre la prevalencia de VDVB en camélidos (Wentz *et al.*, 2003). Estudios serológicos indican que los camélidos sudamericanos son susceptibles a la infección con el VDVB (Mattson, 1994). Los primeros informes basados en la detección de anticuerpos para pestivirus (VDVB) en camélidos entregan valores de un 4 a un 53% (Evermann, 2006). En Sudamérica, en Perú se encontró una prevalencia de 11% en alpacas que se encontraban en contacto con ovinos y bovinos (Rivera *et al.*, 1987; Parreño y Marcoppido, 2006). En Argentina, llamas que cohabitaban con ovinos y bovinos tuvieron una prevalencia cercana al 2% (Puntel *et al.*, 1999; Parreño y Marcoppido, 2006). En Chile se detectó seropositividad para el VDVB en 8/74 (11%) de alpacas y en 6/43 (14%) de llamas de la Región Metropolitana de Santiago (Celedón *et al.*, 2001).

Es discutible si las infecciones de los camélidos se deben a transmisión interespecies o a la posibilidad de que los miembros de este grupo tengan infecciones por pestivirus únicos y propios (Evermann, 2006). El pestivirus aislado con mayor frecuencia tanto en alpacas como llamas es VDVB. Análisis genómicos de la región 5' UTR del VDVB de aislados obtenidos de camélidos han permitido clasificarlos dentro de los subgrupos VDVB-1a, 1b y VDVB-2 (Wentz *et al.*, 2003). Esto ha conducido a la conclusión que el virus se propaga desde el ganado a las llamas y alpacas por propagación interespecie.

Los signos clínicos de infección por VDVB en camélidos son similares a los reportados para bovinos, sin embargo, la manifestación clínica es menos observada que en bovinos (Wentz *et al.*, 2003). Las llamas pueden ser infectadas con VDVB pero pueden o no presentar signología clínica. La inoculación experimental en llamas durante la gestación no resultó en infección fetal o en crías PI (Wentz *et al.*, 2003).

Los estudios de Evermann, 2006 indican que los miembros del grupo de los camélidos son susceptibles a la infección y seroconvierten. La detección de anticuerpos neutralizantes al

VDVB en los sueros de las llamas sugiere que, si las llamas pastan en proximidades a rumiantes PI, pueden seroconvertir al VDVB (Motha y Tham, 1992).

En la última década, los informes clínicos han documentado la enfermedad en llamas y alpacas manifestada como enfermedades respiratorias, entéricas y debilitamiento crónico. En infecciones procedentes desde otros camélidos o bovinos, se describe que la sintomatología que presentan los camélidos depende de la etapa de su vida en que ocurra la infección, así, en el caso de hembras no preñadas que sufren una infección aguda, puede presentar fiebre, disminución del apetito, en algunos casos diarrea, pero puede que también los animales no presenten síntomas. En hembras gestantes se producen infecciones intrauterinas, que dan como resultado el parto de fetos muertos, abortos y nacimiento de una cría PI (Carr y Carman, 2005; ARF, 2006; Evermann, 2006). En el feto el virus puede producir hiperplasia cerebelar, cataratas, ceguera, hipotricosis y retardo del crecimiento (Carr y Carman, 2005; Evermann, 2006). Muchas crías PI son de pobre condición, sin embargo, algunas llegan a adultos sin presentar signos clínicos de enfermedad, no obstante, permanentemente, diseminan grandes cantidades de virus infeccioso al medio ambiente a través de la respiración y todos los fluidos corporales (Carr y Carman, 2005; ARF, 2006).

Cuando se presentan signos clínicos, éstos a menudo comienzan a mostrarse luego de que los anticuerpos del calostro son disipados, y consisten en enfermedades respiratorias crónicas o del tracto alimentario, fiebre, inapetencia, letargo y falla en la ganancia de peso (Mattson *et al.*, 2006). Durante la necropsia de un animal PI eutanasiado a las 24 semanas de edad, se observó presencia de vasos sanguíneos congestivos en toda la superficie de las serosas del tracto intestinal con hiperemia más intensa en la serosa del yeyuno, además de, hemorragias petequiales en la superficie de la serosa de los riñones y una gran cantidad de fluido peritoneal. El virus se aisló desde muestras de pulmones, riñones, fluido de cavidad abdominal y médula ósea (Mattson *et al.*, 2006).

11. DIAGNÓSTICO DEL VDVB

Debido a la gran variedad de manifestaciones clínicas que produce la infección del VDVB, no es posible realizar el diagnóstico clínico con certeza, haciéndose imprescindible el diagnóstico de laboratorio, especialmente en la identificación de animales inmunotolerantes, por la trascendencia epidemiológica que ellos presentan (Duffel y Harkness, 1985; Edwards, 1990).

Como en todas las enfermedades virales, los métodos de diagnóstico pueden orientarse a la detección del virus en el hospedador y/o en la detección de la respuesta inmune del hospedador a la infección. El método adoptado estará sujeto a las necesidades del estudio, no obstante, para interpretar los resultados de las pruebas de diagnóstico es esencial tener un conocimiento de la biología del virus, así como, de la naturaleza y duración de la respuesta del hospedador a las diferentes formas de infección.

12. PRUEBAS DE DETECCIÓN DEL VIRUS.

12.1. AISLAMIENTO VIRAL (AV) E IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS EN CULTIVO CELULAR.

El aislamiento viral desde muestras procedentes de animales sospechosos de estar infectados con el VDVB, consiste en la inoculación de extractos de tejidos en cultivos celulares. Esta prueba ha sido el procedimiento clásicamente empleado para multiplicar y consecuentemente aislar el VDVB.

La muestra más recomendada para realizar AV en un animal en pie, corresponde a muestra de sangre (Duffel y Harkness, 1985; Edwards, 1990; Goens, 2002; Saliki y Dubovi, 2004). La mejor muestra de necropsia o de fetos abortados corresponde a órganos linfoides como el bazo, placas de Peyer de intestino delgado, linfonodos mesentéricos y timo (Saliki y Dubovi, 2004). El virus puede encontrarse libre en el suero o asociado al coágulo. Una mayor sensibilidad en su detección se obtiene al usar la capa flogística de sangre heparinizada (Edwards, 1990). Para hacer el AV se emplean cultivos celulares primarios de riñón, pulmón, cornete nasal y testículo fetal de origen bovino (Edwards, 1990), así como, líneas celulares de

riñón porcino (PK-15) y de riñón bovino (MDBK) (Hussin y Woldehiwet, 1994). Posteriormente, es fundamental hacer una identificación del aislado, lo que se puede lograr a través de diferentes procedimientos. Cuando los aislados son no citopáticos (entre el 70 y 90% de los casos), la identificación se logra aplicando anticuerpos marcados con moléculas fluorescentes o con enzimas (Saliki y Dubovi, 2004) En caso de aislados citopáticos también es posible identificar el aislado por prueba de seroneutralización (Edwards, 1990).

El AV en cultivo celular se describe como una técnica sensible y exitosa, no obstante, se requiere que el virus mantenga su capacidad infectante al momento de inocularse en los cultivos celulares; además, debe realizarse sobre tres pasajes antes de proceder a la identificación del aislado. Por otro lado, se requiere de pruebas adicionales para su identificación; se suma a lo anterior el hecho que en los animales jóvenes la presencia de inmunidad pasiva puede interferir con la multiplicación del virus y además se debe tener en consideración que para realizar el procedimiento de AV se requiere que las células y el suero, empleado para el crecimiento celular, estén libres de contaminación con VDVB. Por el procedimiento antes señalado, la obtención de resultados demora a lo menos 15 días, estando sujeto a muchas variables que pueden hacer fracasar la prueba.

Se han implementado otras técnicas de diagnóstico que tienden a suprimir el proceso de AV, describiéndose para ello la detección de antígenos virales o de genomas virales, directamente en tejidos infectados o en aislados realizados en cultivos celulares, siendo estos dos procedimientos de mayor significancia que la medición de la respuesta inmune (Edwards, 1990).

12.2. TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA (IPI).

Esta prueba permite la identificación de pestivirus a través de la detección de antígenos del virus, ubicados al interior de las células, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales. La unión virus-anticuerpo es evidenciada por antiglobulinas conjugadas con la enzima peroxidasa de rábano picante, la que al actuar sobre el sustrato diaminobencidina produce coloración intracitoplasmática. Puede ser de utilidad para el manejo de un número elevado de

muestras como lo es un "screening" dentro de un rebaño en busca de animales PI. En esta técnica, la sangre es la muestra más comúnmente utilizada (Saliki y Dubovi, 2004). El resultado de la prueba se evidencia mediante observación microscópica de gránulos de color marrón característico, de ubicación intracitoplasmática, en las células en las cuales existe presencia de antígenos virales.

12.3. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES POR PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD).

Se ha descrito la aplicación de la prueba de IFD en cortes o impresiones de tejidos (Meyling, 1970; Roeder y Drew, 1984), como también desde impresiones de capa flogística (Bezek *et al.*, 1988), y consiste en confrontar un conjugado compuesto por anticuerpos monoclonales o policlonales, que se encuentran unidos a un fluorocromo, contra antígenos virales ubicados en el citoplasma de la célula infectada. La unión específica entre el antígeno buscado y el anticuerpo marcado se evidencia a través de la observación con microscopio de luz ultravioleta que permite la emisión fluorescente del fluorocromo utilizado. La técnica de IFD se ha usado con éxito en la identificación de animales persistentemente infectados y en casos agudos de EM (Roeder y Drew, 1984). Las muestras seleccionadas para realizar diagnóstico desde corte de tejido generalmente son tiroides, glándulas salivales, bazo, nódulos linfáticos y sitios cercanos a lesiones en intestino (Edwards, 1990). La utilización de un antisuero policlonal de buena calidad o de anticuerpos monoclonales específicos es esencial para el éxito de la técnica. La intensidad de la fluorescencia varía dependiendo de la cepa viral. Este problema puede ser resuelto a través del empleo de una mezcla de cepas con diversidad antigénica, empleada para la producción de antisuero policlonal específico contra VDVB: además, se recomienda el uso de tinciones como el Azul de Evans o Negro Naftaleno, que aumentarían el contraste con la inmunofluorescencia específica y permitirían una mejor visualización de la estructura tisular o celular facilitando la interpretación y el diagnóstico de la muestra (Edwards, 1990).

12.4. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES POR PRUEBA INMUNOENZIMÁTICA DE ELISA

La prueba ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), para la detección de antígenos virales del VDVB, se implementó por primera vez en la década de los 70 (Engval y Perlmann, 1971). Consiste en detectar la presencia del virus a través del empleo de anticuerpos dirigidos contra antígenos virales obtenidos de lisados de células del animal sospechoso de estar infectado. Para evidenciar la unión específica entre el anticuerpo de búsqueda y el antígeno buscado, se recurre al empleo de un segundo anticuerpo dirigido contra los antígenos virales, pero esta vez unido a una enzima, la que en presencia de un sustrato adecuado, evidenciará una coloración que, según medición espectrofotométrica, señalará la presencia o ausencia de antígenos virales en el lisado celular. Alternativamente, se describe un procedimiento de ELISA en que el segundo anticuerpo usado no lleva adherida la enzima, y en este caso se requiere de un tercer anticuerpo, dirigido contra el segundo, que sí lleva adherida la enzima para evidenciar la cadena de reacción.

ELISA se describe como una prueba de alta sensibilidad en el diagnóstico (Edwards, 1990) por el hecho de no requerir que el virus mantenga su capacidad infectante; además, detecta animales en fase virémica y el antígeno viral no es bloqueado por anticuerpos maternos (Chu *et al.*, 1985; Mignon *et al.*, 1992).

La prueba sirve para detección de animales persistentemente infectados, y usualmente busca el antígeno en lisados de leucocitos sanguíneos periféricos. La nueva generación de ELISAs de captura de antígeno (Erns capture ELISAs[®]), puede detectar antígenos contra VDVB en muestras de sangre entera como en plasma o suero (OIE, 2008). Lo mejor de este método es que da una sensibilidad parecida al aislamiento viral y puede ser preferido en casos raros donde la infección persistente pueda estar combinada con seropositividad. Debido a que la viremia es transitoria, la prueba de ELISA parece ser menos útil para la detección del virus en infecciones agudas de diarrea viral bovina.

El ELISA NS2-3 puede ser menos efectivo en terneros que han consumido calostro debido a la presencia de anticuerpos maternos contra el VDVB.

12.5. DETECCIÓN DEL GENOMA VIRAL POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica PCR, del inglés "Polymerase Chain Reaction" es de creciente aplicación en la detección del VDVB y de otros pestivirus, aunque existen dos limitantes para la implementación exitosa de este procedimiento: la necesidad de extraer el ARN viral y el uso de partidores específicos para la reacción de transcripción reversa y de amplificación. Sin embargo, es un método de alta especificidad, ya que identifica con precisión secuencias nucleotídicas que sólo se encuentran en el ácido nucleico de un virus en particular; es muy sensible, pues es capaz de detectar y amplificar bajas concentraciones del genoma viral; y además, es un procedimiento de rápida entrega de resultados (Hamel *et al.*, 1995) y puede ser utilizado para amplificar y tipificar virus desde cultivos celulares o directamente desde muestras de sangre (OIE, 2008). En teoría cualquier muestra animal puede ser usada para realizar RT-PCR (leche, orina, tejidos, suero, sangre entera, piel, incluso tejidos fijados en formalina) (Saliki y Dubovi, 2004). No obstante, es necesario considerar que la detección del ARN viral no implica *per se* la presencia de virus infectante (OIE, 2008).

Una estrategia para caracterizar genéticamente a distintos aislados de pestivirus, es el tratar el genoma amplificado por PCR con enzimas de restricción (ER). Este procedimiento ocupa como criterio de análisis, la presencia o ausencia de sitios de corte del genoma viral reconocidos por algunas ER, específicos para determinados pestivirus. Esto permite clasificar a los pestivirus entre sí (VDVB, VEF, VPPC) y en genotipos VDVB-1 y VDVB-2 (Vilček *et al.*, 1994).

Por otra parte, la amplificación del genoma de pestivirus por PCR se realiza preliminarmente al análisis de secuencias de nucleótidos. Este procedimiento se utiliza para identificar y diferenciar pestivirus ovinos, porcinos y bovinos (Vilček *et al.*, 1994.; Ridpath y Bolin, 1998) y, además, permite clasificarlos en genotipos y subgrupos (Ridpath y Bolin, 1998).

Para la caracterización genética de los pestivirus los estudios se han centrado en el análisis filogenético de diferentes regiones del genoma, tales como 5' UTR, N^{pro} y E2 (Becher *et al.*, 1997; 1999; 2003; Pellerin *et al.*, 1994; Vilček *et al.*, 2005).

13. CONTROL DEL VDVB

Para controlar la infección por el VDVB es fundamental conocer la situación epidemiológica de este virus en cada región. Ello implica identificar en los predios la condición de animales inmunocompetentes que han estado en contacto con el virus y se encuentran protegidos en forma natural; los animales que son PI; y los animales susceptibles de contraer la infección. Lo recomendable sería eliminar a los animales PI y, dependiendo del número dentro del rebaño, vacunar a los animales susceptibles (Celedón, 1993). No obstante, es de alta utilidad prevenir la introducción de pestivirus en una población animal (Løken, 2000).

Para utilizar la vacunación como método de control, se debe elegir correctamente el tipo de vacuna que se va a utilizar, previniendo principalmente la infección fetal que pueden producir las vacunas modificadas en las hembras en gestación temprana, o la inmunosupresión en los terneros jóvenes (Radostits y Littlejohns, 1988). Estas vacunas modificadas tienen la ventaja de inducir rápidamente la producción de anticuerpos neutralizantes que reaccionan con un amplio rango de aislados del VDVB. De todas maneras, su uso es contradictorio debido al efecto inmunodepresor que pueden provocar en los animales vacunados (Celedón, 1993). También se dispone de vacunas inactivadas en que los efectos adversos están muy disminuidos, pero la respuesta inmune que ellas inducen es más limitada que la producida por las vacunas modificadas (Celedón, 1993). Para tener una adecuada protección es fundamental que las proteínas inmunogénicas de la cepa vacunal estén en sincronía con los antígenos de los virus circulantes en el medio y en especial aquellos aportados por la proteína E2 de la envoltura ya que éstos son responsables de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes que son los que mayoritariamente protegen contra la infección (Løken, 2000).

14. SITUACION DEL VDVB EN CHILE

Entre los años 1983 y 1984 se comienza a sospechar la presencia de la DVB/EM en Chile, basado en hallazgos anatomopatológicos (Fiedler *et al.*, 1986). Esto se confirmó en 1985, cuando se aisló el virus a partir de un brote de EM que afectó a terneros en la zona sur del país (Reinhardt *et al.*, 1986). Posteriormente, se ha aislado en numerosas ocasiones de bovinos

sanos y enfermos así como de fetos abortados (Celedón *et al.*, 1997b) y de bovinos persistentemente infectados (Celedón *et al.*, 1998).

Estudios serológicos denotan una amplia difusión del virus en el país. Prevalencias serológicas demuestran valores de 69,2% para bovinos de la IX y X Regiones (Reinhardt *et al.*, 1990) y de 60% en bovinos de leche y 86% en bovinos de carne de la Región Metropolitana de Santiago (Celedón *et al.*, 1996; 1997a).

A nivel nacional se ha podido determinar mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y enzimas de restricción, la existencia de cepas del VDVB pertenecientes a los genotipos VDVB-1 y VDVB-2, los subgrupos 1a, 1b y 1c (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006). En el análisis de 4 aislados, 2 VDVB-1 y 2 VDVB-2, se observó que todos eran NCP, que no había diferencias en la eficiencia de productividad viral obtenida en cultivos primarios de células de pulmón, riñón, cornete nasal y testículo de bovino, pero antigénicamente no eran exactamente iguales (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

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

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

En CSD se ha detectado seropositividad para el VDVB en 8/74 (11%) de alpacas y en 6/43 (14%) de llamas ubicadas en diferentes rebaños de la Región Metropolitana (Celedón *et al.*, 2001). Desde 5 llamas sin signos de estar enfermas, 2 que abortaron y 1 muerta se ha

aislado VDVB-2. En alpacas, en 3 y 4 clínicamente sanas se aisló VDVB-2 y VDVB-1 respectivamente, y en 2 que abortaron se aisló VDVB-1 (Celedón *et al.*, 2006). Todos los aislamientos se han obtenido de alpacas y llamas que se encontraban ubicadas en diferentes rebaños en la Región Metropolitana de Santiago y en contacto con ganado doméstico. No se han pesquisado animales con anticuerpos para el VDVB en alpacas y llamas de la Región de Arica y Parinacota (Fuentes, 2007), en guanacos de la Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo ni en vicuñas (*Vicugna vicugna*) de la Región de Arica y Parinacota (Celedón *et al.*, 2001).

Por otra parte, se tiene el antecedente que en un rebaño de 200 llamas y alpacas de la Región Metropolitana de Santiago, de 41 hembras preñadas se produjo abortos en 14 hembras y de ellas 9 murieron después de que cursaran con signos respiratorios y/o digestivos, y 15 parieron crías vivas (Miranda, 2000). De los animales sobrevivientes se obtuvo muestras de sangre y de algunos se pudo aislar el VDVB-1, a la vez que en otros se pudo constatar altos títulos de anticuerpos para antígenos de VDVB y en 3 se aisló el virus en dos ocasiones separadas por más de 30 días, en ausencia de respuesta inmune, constatándose la existencia de animales PI (Arce, 2001).

En el mundo, la investigación de la diversidad genética de aislados de campo de pestivirus ha sido un área de gran interés, encontrándose una gran diversidad genética sobre todo de los aislados del VDVB.

No se conoce con certeza si esta diversidad genética produce variación en la expresión clínica de la enfermedad. Junto con esto, la aparición de brotes de mayor virulencia del VDVB, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, asociados a la presencia de variantes nuevas del virus, hace importante determinar la variabilidad genética de estos virus en Chile. Para ello es importante realizar la caracterización genómica de los pestivirus de distintos aislados nacionales ya sea a nivel de genotipos, como también, a nivel de subgrupos dentro de éstos, lo que permitirá comparar nuestros aislados con los descritos en la literatura internacional.

La identificación y caracterización de los aislados virales, además de permitir el diseño de futuras vacunas, permitirá aumentar el conocimiento sobre la biología y la epidemiología de

la enfermedad, además de los problemas que estarían generando los pestivirus en los pequeños rumiantes de nuestro país, con el fin de implementar las medidas de control más adecuadas.

Por todo lo anterior, en esta Memoria de Título se estudia el parentesco genómico de aislados nacionales de pestivirus, obtenidos de ovejas, cabras, alpacas y llamas naturalmente infectadas, mediante el análisis de una fracción del gen de la proteína E2 del VDVB.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los pestivirus que infectan ovejas, cabras, alpacas y llamas en Chile son similares genéticamente entre sí, perteneciendo a los mismos genotipos y subgrupos virales que circulan en el ganado bovino nacional.

OBJETIVO GENERAL

Conocer el parentesco genético de aislados de pestivirus obtenidos desde ovejas, cabras, alpacas y llamas naturalmente infectadas en Chile, por medio de filogenia molecular de una fracción del gen de la proteína E2 de la envoltura viral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Reactivar, en cultivos celulares, aislados de pestivirus obtenidos de ovejas, cabras, alpacas y llamas conservados a -40°C.
- 2- Amplificar por RT-PCR una fracción del gen de la proteína E2 de aislados de pestivirus obtenidos de ovejas, cabras, alpacas y llamas.
- 3- Secuenciar la fracción del gen amplificado por RT-PCR de la proteína E2 de aislados de pestivirus obtenidos de ovejas, cabras, alpacas y llamas.
- 4- Determinar el parentesco genético de las secuencias nucleotídicas de la fracción del gen de la proteína E2 de aislados de pestivirus obtenidos de ovejas, cabras, alpacas y llamas por filogenia molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

Las muestras se obtuvieron de una población de 128 inóculos consistentes en alícuotas de plasma, suero y linfocitos obtenidos entre los años 1998 y 2002 procedentes de 22 ovejas, 23 cabras 51 alpacas y 32 llamas que, preliminarmente, se habían diagnosticado como positivos a pestivirus por prueba de inmunofluorescencia directa y que se encontraban conservados a -40°C en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Algunas muestras fueron obtenidas de rebaños con antecedentes de pérdidas reproductivas.

CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares se realizaron según procedimientos estándar (Edwards, 1990). Se empleó la línea celular Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), libre de contaminación con el VDVB la que se mantuvo mediante subcultivos, que se realizaron cada 4 a 5 días, en botellas de vidrio de 10ml en una concentración de 100.000 células por ml de medio de cultivo MEM: Medio Esencial Mínimo, Cat. N° 41500-067 (GIBCO, BRL), suplementado con buffer HEPES, 5,95 gr/l Cat. N° 11344-041 (GIBCO, BRL); estreptomycin, 100µg/ml, penicilina, 100 UI/ml (Combiótico®); anfotericina B, 2.5 µg/ml (Fungizona®); piruvato de sodio, 1mM, Cat. N° 11360-070 (GIBCO, BRL) y bicarbonato de sodio, 1,5 gr/l, adicionado con suero equino (5%) proveniente del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Los cultivos se incubaron a 37° C, en ambiente húmedo con CO₂ (5%).

REACTIVACIÓN DE AISLADOS DE PESTIVIRUS CONSERVADOS A -40°C

Cada uno de los inóculos se descongeló e inmediatamente se inoculó 200µl sobre una monocapa de aproximadamente 200.000 células cultivadas entre 4 y 20 horas después de

sembradas. El inóculo se incubó durante 1 hora a 37°C, luego se repuso el medio de cultivo y se incubó a 37°C en ambiente húmedo con CO₂ (5%). Posteriormente, se realizaron observaciones microscópicas diarias de la monocapa celular, para evaluar cualquier efecto producido sobre las células. A las 72 horas, los cultivos celulares inoculados fueron congelados a -40°C y descongelados por tres veces sucesivas para producir la lisis celular. Posteriormente, con el lisado celular, se reinocularon nuevas monocapas celulares para luego repetir el procedimiento de igual manera al antes señalado por un mínimo de 5 veces. La última inoculación se realizó en tubos Leighton los que contienen una laminilla de vidrio en la que previamente se cultivó una monocapa celular. Después de 48 horas de incubación, las laminillas fueron lavadas con solución buffer fosfato (PBS) pH 7,6 0,01M por 5 minutos y sumergidas en acetona a -20°C por 10 minutos. Luego de secarlas por 4 horas se conservaron a -20°C hasta realizar la prueba de inmunofluorescencia directa en busca de antígenos de pestivirus.

PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

Las monocapas celulares, conservadas a -20°C, se hidrataron con PBS pH 7,6 0,01M por 5 minutos. Posteriormente, se realizó una tinción con 40µl de una dilución de conjugado policlonal específico para el VDVB (BVD FITC Antiserum, PA 0205, CVL. Weybridge), adicionado de azul de Evans como contra tinción, y se dejó durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Luego, las laminillas se lavaron tres veces con PBS pH 7,6 0,01M y una vez con agua destilada desionizada. Como último paso y luego de secar las laminillas, éstas se montaron sobre una gota de 8µl de glicerina tamponada al 50% en PBS pH 7,6 0,01M, dispuesta en un porta objeto. La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia marca Nikon, modelo Optiphot-2, serie 13767, con aumento de 400x, junto a controles positivos y negativos paralelamente realizados. La presencia de infección viral en las células se determinó por la detección de fluorescencia verde en el citoplasma celular. Se utilizó una escala de positividad de 1 a 4+. Las células no infectadas con el virus se observaron de color rojo.

AMPLIFICACIÓN DE UNA FRACCIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA E2

EXTRACCIÓN DEL ARN VIRAL.

El ARN viral se extrajo desde un lisado de células infectadas con cada uno de los aislados virales, utilizando TRIzol[®] LS Reagent, según las instrucciones del proveedor (Invitrogen, Life Technologies). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para producir lisis de las células. Mediante el uso de cloroformo y posterior centrifugación se produjo separación de la muestra en dos fases por diferencia de densidad; la fase fenólica orgánica que contiene los restos de proteínas denaturadas y la fase superior acuosa que contiene la totalidad del ARN. Luego se transfirió la fase acuosa (500µl aprox.) a un tubo Eppendorf, se adicionó 50µl de ARN de levadura 1mg/ml utilizado como coprecipitante del ARN viral.

Finalmente, se adicionó al tubo un volumen de 550µl de isopropanol el cual precipita el ARN. El ARN total se recuperó luego de 3 ciclos de lavados con etanol al 75% y centrifugación a 7.500xg. Luego de ser secado, se resuspendió en agua destilada incubada con 0,1% de dietil pirocarbonato (DEPC-Treated water), libre de DNAsas y RNAsas. Posteriormente, se incubó por 10 minutos a 60° C. y se almacenó a -20°C.

TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y AMPLIFICACIÓN POR PCR DE UNA FRACCIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA E2 DEL GENOMA VIRAL.

Esto se realizó de acuerdo a las condiciones optimizadas en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los partidores utilizados fueron E2 RT: 5'-TCCAGGTCAAACCCARTATTG-3' (posición 3453-3434 del genoma de la cepa de referencia NADL) y E2 FT: 5'-ACTTTGAATTTGGACTYTGCC-3' (posición 2754-2774 del genoma de la cepa de referencia NADL) (Collett *et al.*, 1988*a*; Tajima *et al.*, 2001). El tamaño del producto esperado es de 700pb (Tajima *et al.*, 2001). Con el fin de obtener mayor cantidad de producto de PCR, La reacción de transcripción inversa y amplificación por PCR de cada muestra se realizó en cuadruplicados. Se utilizó tubos de PCR con un volumen total de 25µl, utilizando el "kit SuperScript[™] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA

Polymerase" (Invitrogen Life Technologies), bajo las siguientes condiciones: 8,5µl de agua DEPC, 12,5µl de buffer 2x Reaction Mix; 1µl de E2-FT 10µM, 1µl de E2-RT 10µM; 1µl de SuperScript™ III RT / Platinum® *Taq* Mix; 1µl de ARN extraído. En el caso del control negativo el ARN extraído fue reemplazado por 1µl de agua DEPC.

La reacción de RT-PCR se realizó en un termociclador con tapa termoregulada (PTC-100. MJ Research Inc.), de acuerdo al siguiente programa: 50°C por 30 minutos; 94°C por 3 minutos; 40 ciclos de alineación-elongación-denaturación del ADN a 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto y 68°C por 1 minuto, respectivamente. Luego del último ciclo, los tubos se incubaron a 68°C por 5 minutos y fueron almacenados finalmente a 4°C.

El fragmento de ADN amplificado se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% en "buffer" Tris borato EDTA (TBE 1x) y teñido con bromuro de etidio.

Para la electroforesis, a 2µl de la mezcla de reacción de PCR se agregó 1µl de "buffer" de carga (loading dye solution 6x, FERMENTAS), 3µl de agua DEPC y se cargó en el gel. La electroforesis se efectuó a 100V por 45 minutos. El gel fue teñido por 25 minutos en una solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml. El fragmento de ADN amplificado se identificó en un transiluminador UV, por comparación con marcadores de peso molecular de ADN de 100-3000pb (Ladder plus, 100bp DNA, 0,1 µg/µl, FERMENTAS).

PURIFICACIÓN DEL ADN AMPLIFICADO POR LA REACCIÓN DE RT-PCR

Los fragmentos amplificados por RT-PCR fueron purificados utilizando el kit "QIAquick® PCR Purification Kit" Cat. Nº. 28104 según las instrucciones del proveedor (QIAGEN). En tubos Eppendorf se agregó 400µl de buffer PBI a los que posteriormente se adicionó 80µl de los productos de PCR obtenidos previamente. La mezcla obtenida para cada muestra se transfirió a columnas con resina incluidas en el kit. Luego de lavar con buffer PE y agua junto con sucesivas centrifugaciones, se obtuvo el producto de PCR purificado correspondiente a cada muestra.

Para determinar si la cantidad de ADN purificado permitía la realización de la secuenciación nucleotídica, éstos fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1,75% en "buffer" TBE 1x en paralelo con un marcador de peso molecular de DNA de 72-1353pb (ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9, FERMENTAS).

Para tal efecto, a 1µl del fragmento del RT-PCR purificado se agregó 1µl de loading dye solution "6x" (FERMENTAS), 4µl de agua DEPC y se cargó en el gel. La electroforesis se efectuó a 80V por 45 minutos. El gel fue teñido por 25 minutos en la solución de bromuro de etidio previamente descrita. El fragmento de ADN amplificado se identificó en el transiluminador UV, por comparación con el marcador de peso molecular. La cantidad de ADN mínima para realizar la secuenciación nucleotídica directa debe corresponder a 15 ng/µl.

SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DEL ADN PURIFICADO

Las secuencias nucleotídicas fueron obtenidas en la empresa GENYTEC. Los amplicones se secuenciaron en ambas hebras, usando los partidores E2 inf 5'-AACGGACCGCCTTCCAGATGG-3' (posición 2825-2846) y E2 inr 5'-TCATATGGTCTGCAAGGCAT-3' (posición 3306-3287) de la cepa de referencia NADL (Collet *et al.*, 1988a; Tajima *et al.*, 2001).

Por otra parte, para realizar el análisis filogenético, se usaron secuencias de cepas de referencia internacionales obtenidas de un banco de datos, "NCBI sequence viewer v2.0" (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) y de aislados virales nacionales obtenidos de bovinos de los cuales se conoce su genotipo, subgrupo y la secuencia genómica del segmento a estudiar. Las características de estos aislados se detallan en el cuadro 5.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas junto con las secuencias de las cepas de referencia internacionales y de aislados bovinos nacionales fueron alineadas utilizando el programa computacional ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) como se muestra en el ANEXO 1.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE UNA ZONA DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA E2

El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas obtenidas se realizó usando el programa computacional MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) de análisis bioinformático (Kumar *et al.*, 1994). En este programa, a las secuencias nucleotídicas alineadas por ClustalW se les calculó las distancias genéticas existentes entre ellas usando el método de

dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980) y los árboles filogenéticos se construyeron usando el método "neighbor-joining" (Saitou y Nei, 1987). La robustez del árbol filogenético obtenido se determinó por un análisis de "bootstrap" de 1000 réplicas (Felsenstein, 1989; Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

CUADRO 5. Detalle de las cepas internacionales y de los aislados de bovinos nacionales utilizados como referencia en este estudio, basados en el análisis de la región codificante de la proteína E2 del VDVB.

IDENTIFICACIÓN CEPA	AÑO	ORIGEN	GENOTIPO	Nº ACCESO	REFERENCIA
NADL	1963	Estados Unidos	1 a	M31182	Collett <i>et al.</i> , 1988
OREGON	--	Estados Unidos	1 a	AF091605	McGoldrick <i>et al.</i> , 1998
OSLOSS	1965	Osloss	1 b	M96687	De Moerlooze <i>et al.</i> , 1993
CP7	1988	Estados Unidos	1 b	AF220247	Becher <i>et al.</i> , 2000
KE9		Alemania	1 b	EF101530	Meyers <i>et al.</i> , 2007
DEER-NZ1		Nueva Zelanda	1 c	AF144614	Becher <i>et al.</i> , 1999
721/96	1996	Alemania	1 d	AF144609	Becher <i>et al.</i> , 1999
DEER-GB1	1986	Reino Unido	1 e	AF144615	Becher <i>et al.</i> , 1999
KS86		Japón	1 e	AB033753	Kirisawa <i>et al.</i> , 1999
4998/89	1989	Alemania	1 f	AJ302959	Tajima <i>et al.</i> , 2001
1891/99	1999	Alemania	1 g	AJ303001	Tajima <i>et al.</i> , 2001
890	1990	EEUU	2 a	U18059	Ridpath y Bolin, 1995
104/98	1998	Alemania	2 a	AJ302961	Tajima <i>et al.</i> , 2001
GI-6	1997	Panamá	2 b	AF144612	Becher <i>et al.</i> , 1999
GI-1	1996	Alemania	2 c	AF104030	Becher <i>et al.</i> , 1999
CH113	1995	Chile	1 b	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH193	1995	Chile	1 a	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH419	1995	Chile	2	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH476	1995	Chile	2	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH511	1993	Chile	1 e	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH693	1996	Chile	2	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH809	1998	Chile	2	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH888	2001	Chile	1 a	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH914	2007	Chile	1 b	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH916	2007	Chile	1 a	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH917	2007	Chile	1 b	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH918	2007	Chile	1 b	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH919	2007	Chile	1 b	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH920	2007	Chile	1 b	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH921	2007	Chile	1 a	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH1025	2007	Chile	1 b	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH1068	2007	Chile	1 a	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar
CH1091	2007	Chile	1 a	--	Pizarro-Lucero, datos sin publicar

RESULTADOS Y DISCUSION

En este estudio, de la población de 128 inóculos que se sometió al proceso de reactivación viral, en 94 hubo multiplicación viral, lo que fue detectado por la presencia de antígenos que reaccionaron con los anticuerpos fluorescentes contra el VDVB en las células co-cultivadas con los inóculos, después de haberse realizado entre 5 y 7 pasajes de los aislados. De éstos, correspondieron: a ovejas 16/22; a cabras 21/23; a alpacas 37/51; y a llamas 20/32.

En el cuadro 6, se observa una distribución de los resultados de la inmunofluorescencia, según una estimación cualitativa del porcentaje de células con inmunofluorescencia, en las laminillas en que se realizó la prueba.

CUADRO 6. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia para el virus diarrea viral bovina realizada sobre células co-cultivadas con inóculos provenientes de pequeños rumiantes

	Ovejas	Cabras	Alpacas	Llamas	Total
Negativos	6	2	14	12	34
+	8	3	10	6	27
++	3	7	15	9	34
+++	4	9	12	4	29
++++	1	2	0	1	4
	22	23	51	32	128

Presencia de fluorescencia: + en algunas células; ++ alrededor del 20%; +++ alrededor del 40%; ++++ en más de un 50%.

De los 94 virus capaces de infectar las células, un virus obtenido de una alpaca (A474) produjo efecto citopático (ECP) que fue observado a partir del sexto pasaje y fue progresivo con los pasajes subsecuentes. El ECP se observó alrededor de 48 horas post inoculación y consistió en redondeamiento y desprendimiento de las células llegando a la destrucción total de la monocapa alrededor de las 72 horas. Este hecho llama la atención, dado que se describe que en la naturaleza la mayoría de los aislados de pestivirus son NCP (Thabti *et al.*, 2002; Saliki y Dubovi, 2004); no obstante, estos antecedentes están referidos a VDVB aislados de bovinos y en este caso el aislado fue obtenido de una alpaca. En un estudio realizado por Celedón *et al.*,

(2006) que incluyó a 42 alpacas y 35 llamas vivas, además de 2 llamas adultas muertas y de un feto de llama abortado, realizado en cultivos celulares, no se observó ECP con ninguno de los virus, es decir, todos los virus eran NCP. Por otro lado, todas las muestras de alpacas, incluidas CP y NCP, procedían de un mismo rebaño, el cual tenía antecedentes que en un período de aproximadamente 6 a 8 meses antes de tomar las muestras habían abortado 26/41 hembras (63%), además de una hembra que parió un mortinato. Del rebaño, 9 hembras adultas presentaron signos digestivos y/o respiratorios y posteriormente murieron. El aislado A474 fue obtenido de una hembra después de 6 a 8 meses de haber abortado con una gestación de 7 meses (Miranda, 2000) (Cuadro 7).

Para el análisis genético, a partir de los 94 aislados virales, se hizo una selección de 39 virus, considerando que procedieran de las cuatro especies en estudio, que tuvieran diferente citopatogenicidad, que el grado de fluorescencia fuera de al menos un 20%, y que se incluyeran muestras procedentes de diferentes lugares geográficos. Estos 39 virus se obtuvieron de 8 ovejas, 11 cabras, 10 alpacas y 10 Llamas (Cuadro 7). De las 39 muestras seleccionadas para amplificar su genoma por RT-PCR utilizando los partidores E2 RT: 5'-TCCAGGTCAAACCACTATTG-3' y E2 FT: 5'-ACTTTGAATTTGGACTYTGCC-3' (posición 3453-3434 y 2754-2774, respectivamente, del genoma de la cepa de referencia NADL) (Collett *et al.*, 1988a; Tajima *et al.*, 2001), en 36 de ellas se obtuvo un ADN con el tamaño de producto esperado de 700pb (Tajima *et al.*, 2001) (Figura 2). Los aislados C127, C150 y C160 no fueron seleccionados para proseguir con el estudio por que el primero resultó negativo en 2 oportunidades y los 2 restantes presentaban una banda muy débil por una baja eficiencia en la reacción de PCR.

CUADRO 7. Antecedentes de los aislados de pestivirus infecciosos obtenidos de ovejas, cabras, alpacas y llamas conservados a -40°C en el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, que fueron seleccionados para amplificar su genoma.

MUESTRA	ESPECIE	PROVINCIA	COMUNA O LOCALIDAD	AÑO	SEXO	IFD
A287****	ALPACA	CHACABUCO	COLINA	1998	HEMBRA	+++
A288****	ALPACA	CHACABUCO	COLINA	1998	HEMBRA	++
A291****	ALPACA	CHACABUCO	COLINA	1998	HEMBRA	+++
A345****	ALPACA	CHACABUCO	COLINA	1998	HEMBRA	++
A385****	ALPACA	CHACABUCO	COLINA	1998	HEMBRA	++
A391****	ALPACA	CHACABUCO	COLINA	1998	HEMBRA	++
A415****	ALPACA	CHACABUCO	COLINA	1998	HEMBRA	+++
A469****	ALPACA	CHACABUCO	COLINA	1998	HEMBRA	+++
A470****	ALPACA	CHACABUCO	COLINA	1998	HEMBRA	++
A474****	ALPACA	CHACABUCO	COLINA	1998	HEMBRA	+++
A502****	ALPACA	CHACABUCO	COLINA	1998	HEMBRA	++
LL621*	LLAMA	SANTIAGO	LA PINTANA	1999	S/A	++++
LL625*	LLAMA	SANTIAGO	LA PINTANA	1999	S/A	++
LL793**	LLAMA	SANTIAGO	MAIPÚ	1999	HEMBRA	+++
LL795**	LLAMA	SANTIAGO	MAIPÚ	1999	HEMBRA	+++
LL1084***	LLAMA	SANTIAGO	LA PINTANA	2000	MACHO	++
LL1723***	LLAMA	SANTIAGO	INDEPENDENCIA	2002	MACHO	++
LL1724***	LLAMA	SANTIAGO	INDEPENDENCIA	2002	HEMBRA	++
LL1731***	LLAMA	SANTIAGO	INDEPENDENCIA	2002	HEMBRA	+++
LL1732***	LLAMA	SANTIAGO	INDEPENDENCIA	2002	HEMBRA	+++
LL1734***	LLAMA	SANTIAGO	INDEPENDENCIA	2002	HEMBRA	+++
O1324*	OVEJA	CORDILLERA	PIRQUE	2001	HEMBRA	+++
O1326*	OVEJA	CORDILLERA	EL ALFALFAL	2001	HEMBRA	++++
O1348**	OVEJA	CORDILLERA	LAS MELOZAS	2001	HEMBRA	++
O1349**	OVEJA	CORDILLERA	EL ALFALFAL	2001	S/A	++
O1360*	OVEJA	MELIPILLA	MELIPILLA	2001	HEMBRA	++
O1388**	OVEJA	TALCA	CAMARICO	2001	HEMBRA	++
O1564*	OVEJA	MAGALLANES	LOS COIPOS	2001	S/A	+++
O1730*	OVEJA	MAGALLANES	SAN GREGORIO	2002	S/A	+++
C81*	CABRA	CHACABUCO	TILTIL	1998	HEMBRA	+++
C127**	CABRA	LIMARÍ	OVALLE	1998	HEMBRA	++
C150**	CABRA	LIMARÍ	OVALLE	1998	HEMBRA	+++
C160*	CABRA	LIMARÍ	SOTAQUI	1998	HEMBRA	++
C167*	CABRA	LIMARÍ	S/A	1998	HEMBRA	+++
C1307*	CABRA	S/A	S/A	2001	S/A	+++
C1316**	CABRA	CHACABUCO	LAMPA	2001	HEMBRA	++++
C1322*	CABRA	CORDILLERA	PIRQUE	2001	HEMBRA	+++
C1337**	CABRA	CORDILLERA	LAS MELOZAS	2001	HEMBRA	+++
C1377**	CABRA	TALCA	CAMARICO	2001	HEMBRA	++++

S/A: Sin Antecedentes; **IFD:** Inmunofluorescencia directa, obtenida en este estudio; *****: sin antecedentes sanitarios del rebaño; ******: antecedentes de aborto dentro del rebaño; *******: antecedentes de muerte dentro del rebaño; ********: antecedentes de abortos y muertes de adultos dentro del rebaño.

De los 36 productos de ADN amplificados por PCR que posteriormente fueron purificados, 35 presentaron una concentración de ADN de al menos 15 ng/μl, suficiente para

realizar el proceso de secuenciación de nucleótidos. La muestra O1349 presentó una concentración de ADN insuficiente para realizar el proceso de secuenciación directa.

De las 35 secuencias obtenidas, en 10 de ellas el largo de la secuencia nucleotídica fue muy corta en comparación a las cepas de referencia y al resto de las muestras en estudio, por lo que se decidió marginarlas de la alineación.

En definitiva se realizó la alineación de secuencias nucleotídicas de 25 aislados procedentes de 6 ovejas, 3 cabras, 7 alpacas y 9 llamas, junto con las secuencias de las cepas de referencia internacionales y de aislados bovinos nacionales mediante el programa computacional ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), obteniéndose una zona de comparación de 388 nucleótidos (Anexo 1).

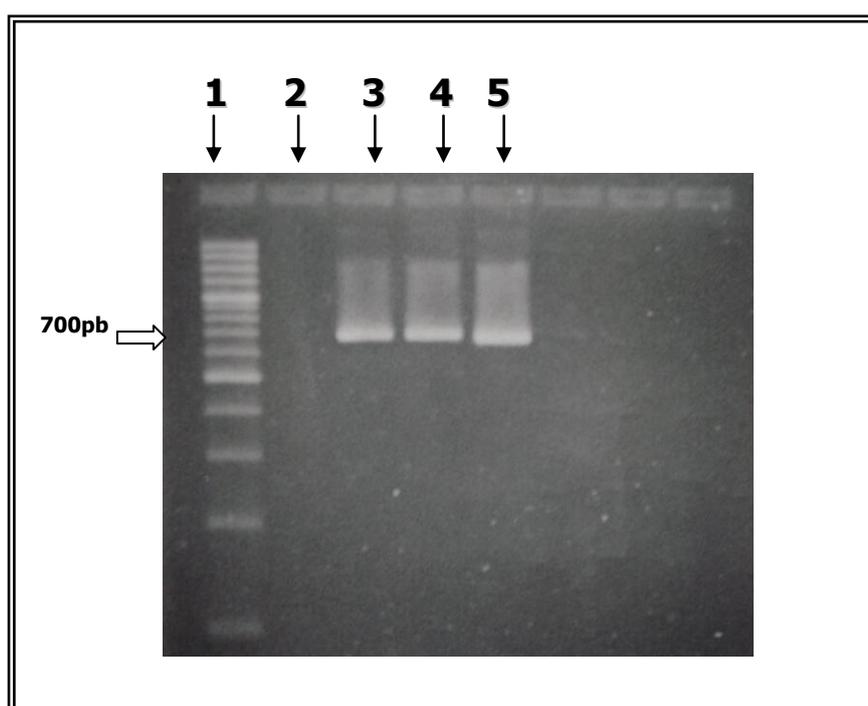


FIGURA 2. Amplificación por RT-PCR de la región codificante de la proteína E2 del VDVB. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 1x del fragmento amplificado. **1:** marcador de peso molecular (Ladder plus, 100bp DNA, 0,1 µg/µl, FERMENTAS); **2:** control negativo sin ARN viral para los partidores E2 FT y E2 RT; **3** (LL625), **4** (LL1723) **y 5** (LL1731): fragmentos de aproximadamente 700 pb, correspondientes a muestras positivas al VDVB, obtenidos al amplificar 3 aislados con los partidores E2 FT y E2 RT.

El cuadro 8 muestra los porcentajes de homología de todas las secuencias alineadas mediante clustalW. Del cuadro se concluye que 4 aislados (A291, A391, A415, A474) presentan una homología que fluctúa entre 82 y 91% con las cepas de referencia Osloss, KE9 y CP7 aisladas de bovinos y que corresponden al subgrupo VDVB-1b (Becher *et al.*, 1999; Nagai *et al.*, 2004; Tajima, 2004; Meyers *et al.*, 2007). Este resultado es similar al descrito por Kim *et al.*, (2008), donde el análisis filogenético de las regiones 5'UTR y N^{pro} de aislados de pestivirus obtenidos de 46 alpacas PI procedentes de 8 estados diferentes de EEUU y de Canadá demostró que el 100% de los aislados correspondían a VDVB-1b con porcentajes de homología de 99,3 a 100%. Sin embargo, la mayoría de los aislados (21) presentan un rango de homología que fluctúa entre el 96 y el 98% con las cepas Deer-GB1 y KS86 correspondientes al subgrupo VDVB-1e (Becher *et al.*, 1999; Nagai *et al.*, 2004; Tajima, 2004).

Las distancias genéticas existentes entre las secuencias alineadas previamente por ClustalW, fueron calculadas usando el método de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980), y el árbol filogenético de consenso fue construido usando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). La robustez del árbol filogenético obtenido fue evaluada mediante un análisis de "bootstrap" de 1000 réplicas (Felsenstein, 1989; Pizarro-Lucero *et al.*, 2006) (figura 3).

CUADRO 8. Porcentajes de homología entre las cepas de referencia internacionales del VDVB versus cepas nacionales de bovinos y de las cepas en estudio.

	CH193	CH888	CH916	CH921	CH914	CH917	CH918	CH919	CH920	CH511	CH419	CH476	1091	1068	1025	113	809	693	C81	C1307	C1316	O1326	O1348	O1360	O1388	O1564	O1730	A291	A385	A391	A415	A469	A474	A502	LL621	LL625	LL1724	LL793	LL795	LL1084	LL1723	LL1731	LL1732		
NADL	100	100	79	84	71	72	72	72	72	77	65	65	83	83	71	70	65	65	76	76	76	76	76	76	76	76	76	67	76	67	64	76	70	76	76	76	74	74	74	76	74	73	73		
OREGON	84	84	87	87	73	74	72	73	73	75	66	66	87	87	73	73	66	66	75	75	75	75	76	75	75	75	75	75	71	75	72	71	75	72	75	76	76	75	75	75	75	75	75	75	
OSLOSS	70	70	73	72	89	90	90	90	91	72	64	64	72	72	90	89	64	64	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	82	72	84	83	72	88	72	72	72	71	72	71	72	72	71	71	
CP7	67	67	71	71	86	85	85	85	86	69	61	61	70	70	86	84	61	61	69	69	69	69	69	69	69	69	69	69	82	69	84	84	69	83	69	69	69	68	68	68	69	69	68	68	
KE9	71	71	75	74	92	94	93	93	94	70	61	61	73	73	94	92	62	62	70	70	70	70	71	70	70	70	70	70	84	70	86	85	70	91	70	70	70	70	70	70	70	70	70	69	70
DEER-NZ1	77	77	75	78	73	74	73	73	73	73	65	65	78	78	73	72	66	66	73	72	73	73	74	73	73	73	73	69	73	71	70	73	71	73	74	73	73	73	73	73	73	73	72	73	
721/96	71	71	75	75	70	69	68	68	69	70	65	65	76	76	69	69	66	66	70	70	70	70	71	70	70	70	70	70	67	70	69	67	70	69	70	71	71	70	70	70	70	70	70	70	70
DEER-GB1	77	77	74	75	72	72	72	72	72	97	65	65	74	74	72	71	65	65	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	70	98	69	69	98	70	98	98	97	97	97	97	98	97	97	97	97
KS86	77	77	75	75	72	72	72	72	72	97	64	64	75	75	72	71	64	64	97	97	97	97	97	97	97	97	98	97	70	97	69	69	97	71	97	97	97	96	97	97	97	97	96	96	
4998/89	70	70	72	72	69	69	69	69	69	70	65	65	72	72	68	69	65	65	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	66	70	69	68	70	69	70	71	70	70	70	70	70	70	70	69	
1891/99	73	73	72	74	73	73	72	73	72	76	66	66	74	74	72	72	65	65	75	75	75	75	75	75	75	75	76	75	70	75	71	71	75	71	75	75	75	75	75	75	75	75	75	74	74
890	63	63	62	62	65	63	63	64	63	63	95	95	62	62	63	65	95	95	62	62	62	62	63	62	62	62	62	62	61	62	62	61	62	64	62	63	63	63	63	61	61	62	61	61	61
104/98	63	63	61	58	63	63	65	65	64	63	89	89	58	58	64	63	89	89	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	63	65	62	62	62	62	62	62	62	61	61	62	61	60	61
GI-6	65	65	66	64	65	65	65	66	66	64	81	81	64	64	65	65	82	82	63	63	63	63	63	63	63	63	63	61	63	63	62	63	65	63	64	64	63	63	63	63	63	63	62	63	
GI-1	62	62	64	64	63	62	62	64	63	62	88	88	64	64	63	64	88	88	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	46	62	53	54	62	64	62	62	62	62	62	62	62	62	61	61	

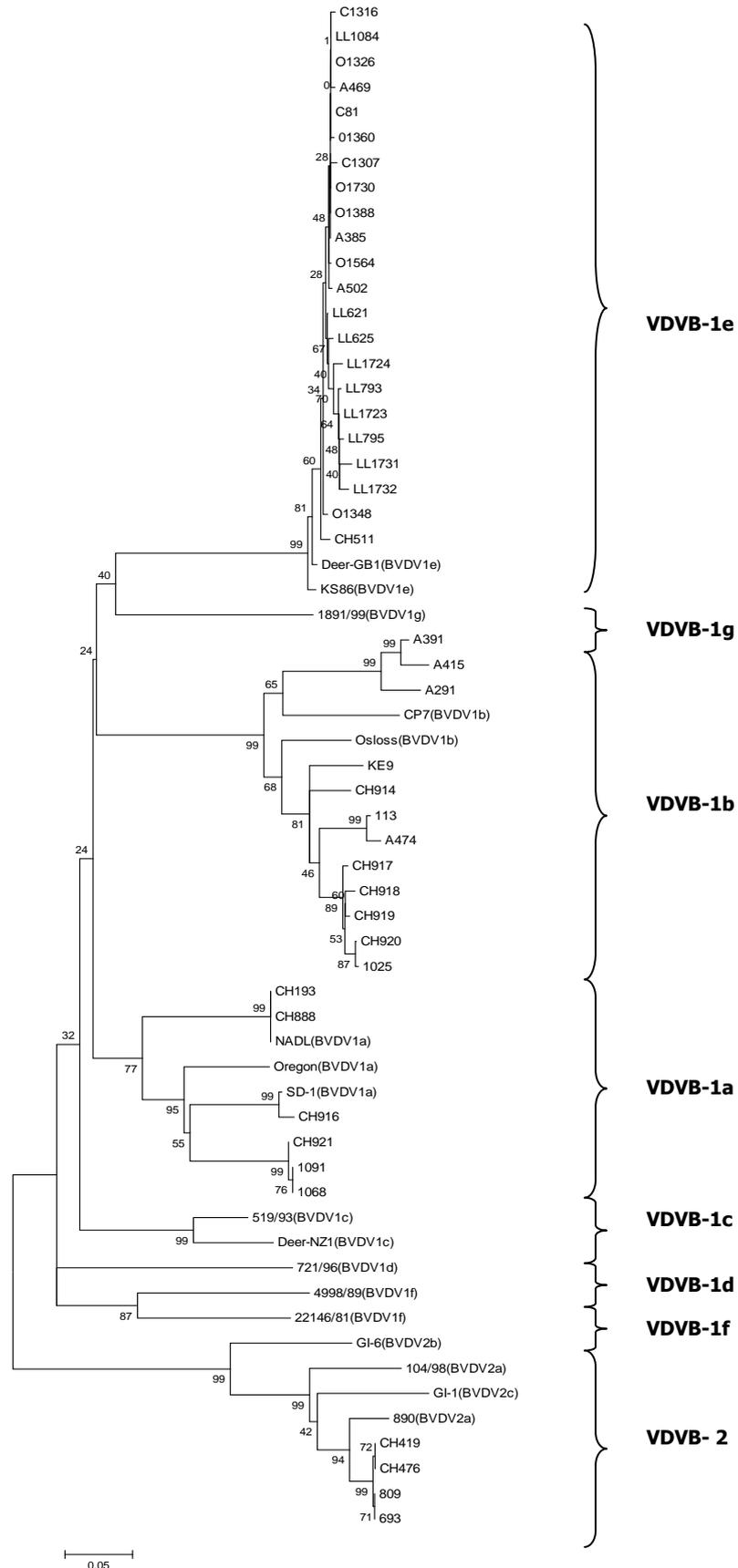


FIGURA 3. Árbol filogenético basado en un segmento de 388 nucleótidos correspondiente a un fragmento del gen que codifica para la proteína E2, pertenecientes a 61 aislados de pestivirus que incluye aislados de ovejas, cabras, alpacas y llamas, además de secuencias pertenecientes a bovinos chilenos (Pizarro-Lucero, 2007. Datos sin publicar). El resto del árbol corresponde a secuencias de E2 obtenidas de un banco de genes (GENBANK) (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html), pertenecientes a cepas de referencia de aislados de VDVb. La construcción del árbol incluyó el método Neighbor-Joining, análisis de 2 parámetros de Kimura y análisis de bootstrap de 1000 réplicas.

El árbol filogenético muestra que de los 25 aislados 4 (16%) - A291, A391, A415 y A474 - (correspondientes a alpacas de un mismo rebaño) se ubicaron dentro del genotipo VDVB subgrupo 1b; y 21 (84%) se ubicaron dentro del mismo genotipo, pero en el subgrupo 1e (figura 3). Existe poca evidencia bibliográfica relacionada con trabajos realizados en pequeños rumiantes domésticos que evalúen parentesco genómico a partir del análisis de la región codificante del gen de la proteína E2 del VDVB.

En el subgrupo 1b, que es considerado como el subgrupo predominante en varios países del mundo incluido EE.UU (Tajima y Dubovi, 2005; Tajima, 2006; Ståhl *et al.*, 2009), también se ubican varios de los aislados chilenos obtenidos de bovinos -CH113, CH914, CH917, CH918, CH919, CH920 y CH1025 -, lo que podría estar indicando que la infección con pestivirus en estas alpacas es de origen bovino y no correspondería a un virus propio de la especie. Las tres alpacas restantes - A469, A385 y A502 - (también pertenecientes al mismo rebaño antes mencionado) se ubican en el subgrupo 1e junto con el resto de los aislados analizados en este estudio (procedentes de llamas, ovejas y cabras). Llama la atención que en un mismo rebaño de alpacas estén presente dos subgrupos (1b y 1e) lo que podría deberse a la introducción de animales desde otras zonas de crianza. Una situación diferente ocurrió en Canadá y EE.UU. en que aislados de alpacas obtenidos de 8 estados diferentes que fueron secuenciadas en 5'UTR y N^{pro} demostraron que todos los aislados pertenecían al VDVB-1b con porcentajes de homología de 99,3 a 100% (Kim *et al.*, 2008). Cabe destacar, que en Chile, además de los aislados de alpacas identificados como VDVB-1b y VDVB-1e, se ha aislado VDVB-2 de alpacas clínicamente sanas ubicadas en otros rebaños de la Región Metropolitana de Santiago (Celedón *et al.*, 2006). Como se mencionó anteriormente, todas las alpacas analizadas pertenecían a un mismo rebaño, donde se había producido aborto en el 63% de las hembras preñadas, muerte de 9/200 (4,5%) animales adultos, con signos respiratorios y digestivos (Miranda, 2000). Además, en este mismo rebaño se detectó la presencia de animales PI (Arce, 2001). En este estudio, se pudo constatar que los aislados VDVB-1e -A469, A385 y A502- y los aislados VDVB-1b -A291 y A415 - procedían de alpacas que no habían abortado y que parieron crías a término, con excepción de la A502 que fue obtenido de una cría. Las alpacas A391 y A474 (VDVB-1b) ambas procedían de animales que habían abortado en el tercer y séptimo mes

de gestación, respectivamente, lo que sugiere que los dos subgrupos presentes en el mismo rebaño serían de diferente virulencia, haciéndose necesario realizar otros estudios para confirmar esta hipótesis.

En relación a los aislados obtenidos de llamas, ovejas y cabras, sólo se encontró presencia de VDVB-1e. Contrariamente a lo acontecido con las alpacas, en este caso, llama la atención la baja diversidad entre los aislados a pesar de que las muestras procedían de animales ubicados en diferentes regiones del país, -llamas de la Región Metropolitana de Santiago; ovinos de las Regiones Metropolitana de Santiago, de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo y de Magallanes y Antártica Chilena; y cabras de las Regiones de Coquimbo y Metropolitana de Santiago-. Este antecedente estaría demostrando que el VDVB-1e estaría ampliamente distribuido en la población de pequeños rumiantes del país, lo que concuerda con el estudio realizado en bovinos chilenos por Donoso (2009) en el cual se analizó por filogenia molecular la región 5'UTR del VDVB de 45 aislados obtenidos de animales asintomáticos y con distintos cuadros clínicos y cuyo resultado arrojó la presencia del genotipo VDVB-1 en 40/45 y los 5 restantes segregaron en el genotipo VDVB-2. Dentro del genotipo VDVB-1, 20/40 (50%) de los aislados fueron clasificados dentro del subgrupo VDVB-1j (1e al analizar la fracción de E2), por lo que su presencia en pequeños rumiantes se debería a un virus adquirido de la especie bovina. Dentro de nuestros resultados, de los aislados obtenidos de bovinos sólo 1/18 (CH511) corresponde a este genotipo y subgrupo y los 17 restantes se han identificado como VDVB-1 a, VDVB-1 b y VDVB-2 (Pizarro-Lucero, datos sin publicar) (Figura 3).

Por otra parte, está descrito que los pequeños rumiantes pueden infectarse con otros genotipos del VDVB. Es así como, en un estudio, cuya finalidad fue realizar la caracterización molecular de pestivirus de ovinos, se analizó las regiones 5'UTR, N^{pro} y la región que codifica para la proteína C de 48 aislados obtenidos durante un período de 18 años en Gran Bretaña, Suecia y Nueva Zelanda lo que permitió clasificarlos dentro de los genotipos VEF, VDVB-1 y VDVB-2. Con esto se demostró que los ovinos pueden ser naturalmente infectados no sólo con el VEF sino que también con el VDVB-1 y con el VDVB-2 (Vilček, *et al.*, 1997). En otro estudio, realizado con aislados pertenecientes a ovinos de Túnez, en que se analizaron las regiones E2,

5'UTR y N^{pro}, se postuló la presencia de un nuevo subgrupo dentro del genotipo VEF debido a que el análisis filogenético ubicó a estos aislados en una rama filogenética independiente situada entre VEF y VPPC. Considerando el resultado del análisis filogenético y el hospedero de origen (ovino) se propuso el genotipo VEF-4 (Thabti *et al.*, 2005). Por otra parte, en una caracterización genética de 32 aislados de pestivirus obtenidos de ovinos en Francia entre los años 1985 y 2006, en que se analizaron las regiones 5'UTR y N^{pro}, 6 aislados fueron clasificados como VEF-3 y 2 aislados presentaron secuencias similares a las descritas para los aislados de Túnez (VEF-4). El resto de los aislados segregó en 2 ramas filogenéticas distintas de las descritas hasta entonces, por lo que este estudio propuso la incorporación de 2 nuevos genotipos, VEF-5 y VEF-6 (Dubois *et al.*, 2008). Un estudio de vigilancia en ovinos de la India, basado en el análisis genómico de N^{pro}, determinó la presencia de VDVB-2b en 1 aislado de los 1561 aislados estudiados. Este corresponde al primer aislamiento de VDVB-2b en ovinos (Mishra *et al.*, 2008) ya que este genotipo y subgrupo sólo había sido descrito en bovinos de Brasil dentro de Sudamérica, y en los países europeos de Portugal y Eslovaquia (Flores *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2006; Vilček *et al.*, 2001, 2002).

En cuanto a caprinos, en Italia se analizó las regiones 5'UTR y N^{pro} de pestivirus aislados de fetos caprinos con signos clínicos similares a EF. En este caso el análisis filogenético de un aislado presentó porcentaje de homología menor al 72% lo que hizo pensar en la presencia de una nueva especie viral (De Mia *et al.*, 2005). En tanto que en cabras de la India, se ha identificado VDVB-2 (Mishra *et al.*, 2007).

En camélidos sudamericanos domésticos, un antecedente disponible que hace referencia a subgrupos, señala que aislados obtenidos de alpacas de Canadá y EE UU, por secuenciación del gen 5'UTR y N^{pro} corresponden al VDVB-1b (Kim *et al.*, 2008).

Dentro de las diferentes regiones del genoma de los pestivirus, la región correspondiente al gen que codifica para la proteína E2 es una de las regiones más variables (Becher *et al.*, 1999). Esto le confiere gran utilidad al momento de realizar análisis filogenéticos de pestivirus (Van Rijn *et al.*, 1997; Vilček *et al.*, 1997; Becher *et al.*, 1999; Tajima, 2006) ya que, permite establecer mayores diferencias filogenéticas dentro de un subgrupo que cuando se analizan las regiones 5' UTR y N^{pro} que son regiones más conservadas (Ridpath, 2003). Es así

que el análisis filogenético de las regiones de E2 y también de N^{pro} sirvió para proponer a la cepa Deer-GB1 dentro de un nuevo subgrupo, VDVB-1e (Becher *et al.*, 1999). En este mismo estudio se analizaron secuencias correspondientes a aislados de pestivirus obtenidos de un reno y de un bisón y se concluyó que en ambos casos, las secuencias nucleotídicas de estas especies se agrupaban separadas del resto de los pestivirus y dentro de éstos, se acercaban en mayor proporción al VEF por lo que estaba en duda si eran nuevas especies virales, o bien, subgrupos dentro del VEF.

En el caso del análisis de la región E2 en bovinos, en el año 2001, se realizó un estudio en Lower Saxony, Alemania, para evaluar la prevalencia de los genotipos 1 y 2 del VDVB, utilizando aislados obtenidos en diagnósticos de rutina de un período de 40 años (Tajima *et al.*, 2001). De los 66 aislados analizados 2 correspondieron al VDVB-2a, 1 segregó en VDVB-2c, el resto de los aislados se ubicó dentro del genotipo VDVB-1, de éstos, sólo 1 se ubicó dentro del subgrupo 1a junto con las cepas de referencia NADL y Oregon C24V; 31 y 24 segregaron dentro de los grupos 1b y 1d, respectivamente. Junto con esto, el análisis determinó que hubo aislados que segregaron en nuevos subgrupos los que fueron denominados VDVB-1f y VDVB-1g. En el año 2005, Tajima y Dubovi seleccionaron 53 aislados virales de bovinos obtenidos entre los años 1998 y 2001 en 16 estados de EE.UU. y realizaron un análisis filogenético a partir de secuencias de 420 nucleótidos correspondientes a una fracción de la proteína E2. Como resultado, se obtuvo que 32 (60%) de los aislados correspondían a VDVB-1 y 21 (40%) a VDVB-2. Luego del análisis filogenético, se determinó que dentro de los aislados VDVB-1, 26/32 (81%) segregaron dentro del subgrupo VDVB-1b, 6/32 correspondieron a VDVB-1a. La totalidad de los aislados correspondientes al VDVB-2 segregó dentro del subgrupo 2a. Este análisis filogenético utilizando el segmento correspondiente a E2 generó resultados similares a los obtenidos también dentro de EE.UU. pero utilizando el segmento 5'UTR (Ridpath *et al.*, 1994; Vilček *et al.*, 2001). Otro estudio similar utilizando E2, fue realizado para evaluar los genotipos presentes en Japón, Alemania y EE.UU. el cual incluyó 46, 61 y 56 aislados de bovinos respectivamente. Según los resultados obtenidos se determinó que el genotipo mayoritario en los 3 países, correspondió a VDVB-1b. En segundo lugar se ubicaron VDVB-1a, VDVB-1d y VDVB-2 en Japón, Alemania y EE.UU respectivamente (Tajima, 2006).

En este estudio, se incluyó el análisis filogenético del gen de la proteína E2 de aislados nacionales obtenidos de bovinos (Pizarro Lucero, datos sin publicar) los que fueron reconocidos como VDVB-1a, 1b y 1e además de VDVB-2, concordando con los resultados obtenidos previamente al analizar la región 5'UTR (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

Cabe destacar que la cepa chilena de bovino CH511, incluida en este estudio segregó en el subgrupo VDVB-1e, en tanto que en el análisis de la región 5'UTR se ubicó dentro del subgrupo VDVB-1c (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006), subgrupo que en la actualidad por el análisis de la región 5'UTR y N^{pro} de 3 aislados de bovinos provenientes de Mozambique se ha reclasificado como subgrupo 1j (Vilček, *et al.*, 2001). Con esto se demuestra que un mismo aislado, dependiendo de la región del genoma viral que se analice podría segregarse en distinto subgrupo (Tajima, 2004). Se reafirma este hecho, por estudios donde el análisis de la región 5'UTR de cepas como Deer-GB1 y KS86, son clasificados como VDVB-1j (Nagai *et al.*, 2008; Jackova *et al.*, 2008) en tanto que al ser analizadas en el segmento que codifica para E2 son clasificadas como VDVB-1e (Becher *et al.*, 1999; Tajima, 2004). Este antecedente sólo cobra importancia en casos puntuales, como lo es el caso de la cepa CH511, ya que no implica cambios genéticos del virus o que pertenezca a genotipos distintos, sólo tiene utilidad desde el punto de vista de la clasificación. Por el contrario, en la mayoría de los casos, sobre todo relacionados con los subgrupos más prevalentes, existe equivalencia al analizar diferentes regiones en forma simultánea, además, la información existente actualmente con respecto al análisis según las regiones 5'UTR y N^{pro} divide al VDVB-1 en al menos 11 subgrupos (Vilček *et al.*, 2001; Vilček *et al.*, 2004) en cambio al ser analizado según la región que codifica para E2 se divide en 7 subgrupos (Tajima *et al.*, 2001; Tajima, 2004).

Por otra parte, un estudio que incluyó 25 aislados correspondientes a bovinos de Perú (15) y Chile (10) analizando la región correspondiente a 5'UTR determinó que la totalidad de los aislados correspondieron al VDVB-1 de los cuales 23 fueron clasificados como VDVB-1b, los 2 restantes correspondientes a aislados chilenos segregaron dentro del subgrupo 1a. Estos resultados intentan explicar la influencia de la importación de ganado, ya sea desde EE.UU. como de Europa, sobre todo carentes de antecedentes sanitarios concernientes a la infección con VDVB (Ståhl *et al.*, 2009). En Argentina, se confeccionó un árbol filogenético utilizando 25

aislados de VDVB obtenidos en ese país, basado en un segmento de 245 nucleótidos de la región 5'UTR. El resultado mostró la presencia de VDVB-1 y VDVB-2 en un 89 y 11%, respectivamente, y dentro de subgrupos, la presencia de VDVB-1 a y 1 b. Este resultado, que revela la existencia de VDVB-2, sumado a la existencia de aislados virales de VDVB-1 que difieren de las cepas de referencia, comúnmente usadas en la elaboración de vacunas, deja en evidencia la importancia y la necesidad de caracterizar genéticamente los aislados de campo, para que éstos sean considerados al momento la fabricación de reactivos como también de vacunas (Jones, *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos, indican que las secuencias nucleotídicas de un segmento del gen de la proteína E2 de aislados obtenidos de alpacas, llamas, ovejas y cabras, analizados por filogenia molecular corresponden en un 84% a VDVB-1e y en un 16% a VDVB-1b. La explicación más probable de la presencia de pestivirus en los pequeños rumiantes domésticos estudiados sería por transmisión interespecie desde el ganado bovino nacional.

Edwards (1990), señala que la intensidad de la fluorescencia varía entre las diferentes cepas virales lo que se encuentra estrechamente relacionado con la eficiencia replicativa en cultivos celulares propia de cada cepa. Esta afirmación está siendo motivo de estudio en el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, en el que se evalúan aislados virales del VDVB pertenecientes a distintos subgrupos y dentro de los resultados preliminares se ha observado que uno de los aislados virales en estudio (CH511), que al análisis filogenético de la región 5'UTR perteneciente al subgrupo 1j (Pizarro-Lucero, 2006), presenta una alta eficiencia replicativa a diferencia de aislados pertenecientes a otros subgrupos (Santana, datos sin publicar).

Dado que uno de los criterios de selección de las muestras para este estudio fue que el porcentaje de células fluorescentes fuera de al menos un 20%, en este caso, se seleccionaron aislados con 5 a 7 pasajes en cultivos celulares, por lo que no se descarta la posibilidad de que en los aislados de pestivirus de pequeños rumiantes conservados en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile se encuentren otros pestivirus, con menor habilidad para multiplicarse, diferentes a los hasta aquí detectados, y que probablemente, podrían corresponder a cepas con genotipos diferentes.

CONCLUSIÓN

Mediante el análisis por filogenia molecular de una zona del gen que codifica para la proteína E2 de virus obtenidos desde ovejas, cabras, alpacas y llamas de Chile, naturalmente infectadas con pestivirus, fue posible detectar la presencia del virus de la diarrea viral bovina genotipo 1 (VDVB-1), y dentro de este genotipo, la presencia de los subgrupos VDVB-1b y VDVB-1e.

BIBLIOGRAFIA

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

ARF (ALPACA RESEARCH FOUNDATION). 2006. Alpaca Research Foundation Update: Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in camelids. [en línea]

<http://www.alpacaresearchfoundation.org/> [consulta: 11-10-2008].

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

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

BAKER, J.C. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: A review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 190: 1449-1458.

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

BARLOW, R.M.; GARDINER, A.C.; NETTLETON, P.F. 1983. The pathology of spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical Border disease. J. Comp. Path. 93: 451-461.

BARROS, S.; RAMOS, F.; PAUPERIO, S.; THOMPSON, G.; FEVEREIRO, M. 2006. Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. Virus Res. 118: 192-519.

BARSALLO, J. 1985. Agentes bacterianos encontrados en el aparato respiratorio de alpacas aparentemente normales. Anales V Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Cuzco, Perú. p36.

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

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

BECHER, P.; AVALOS RAMIREZ, R.; ORLICH, M.; CEDILLO ROSALES, S.; KÖNIG, M.; SCWEIZER, M.; STALDER, H.; SCHIRRMEIER, H.; THIEL, H. 2003. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. Virology. 311: 96-104.

BEER, M.; WOLF, G.; KAADEN, O. 2002. Phylogenetic analysis of the 5'-untranslated region of German BVDV type II isolates. *J. Vet. Med. B* 49: 43-47.

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

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

BONACIC, C. 1991. Características biológicas y productivas de los camélidos sudamericanos. *Avances en Medicina Veterinaria*. Vol 6(2). [en línea] http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/CDA/avan_vet_completa/0,1424,SCID%253D9975%2526ISID%253D473,00.html [consulta: 06-01-2009].

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.

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

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

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

CARR, N.; CARMAN, S. 2005. BVD Virus: A newly recognized serious health problem for alpacas. *Alpacas Magazine*. [en línea] http://www.alpacaresearchfoundation.org/papers_reports/BVDV%20-%20A%20Newly%20Recognized%20Serious%20Health%20Problem.pdf [consulta: 11-10-2008].

CELEDÓN, M. 1993. Nuevos antecedentes en el comportamiento del virus de la diarrea viral bovina. Situación en Chile. *Av. Cs. Vet.* 8(1); 11-17.

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 rinotraqueitis infecciosa bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. *Av. Cs. Vet.* 11: 75-80.

CELEDÓN, M.; PALACIOS, L.; PIZARRO, J.; IBARRA, L. 1997a. 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. 1997b. Puesta en evidencia del virus de la diarrea viral bovina en bovinos clínicamente afectados. *Arch. Med. Vet.* 29: 189-195.

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

CELEDÓN, M.; SANDOVAL, A.; DROGUETT, J.; CALFÍO, R.; ASCENCIO, L.; PIZARRO-LUCERO, J.; NAVARRO, C. 2001. Pesquisa de anticuerpos seroneutralizantes para pestivirus y herpesvirus en ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos de Chile. Arch. Med. Vet. 2: 165-172.

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.

CHASE, C.C.L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A.A.A. 2004. The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. Vet. Clin. Food Anim. 20: 95-114.

CHU, H. J.; ZEE, Y. C.; ARDANS, A.A.; DAI, K. 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus in bovine sera. Vet. Microbiol. 10: 325-333.

COLLETT, M.; LARSON, R.; GOLD, C.; STRICK, D.; ANDERSON, D. K.; PURCHIO, A.F. 1988a. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. Virology. 165: 191-199.

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

CORAPI, W.; FRENCH, T.; DUBOVI, E. 1989. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytotoxic bovine viral diarrhea virus. J. Virol. 63: 3934-3943.

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

DE MIA, G.M., GREISER-WILKE, I.; FELIZIANI, F.; GIAMMARIOLI.; DE GIUSEPPE, A. 2005. Genetic characterization of a caprine pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup. J. Vet. Med. 52: 206-210.

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.

DUBOIS, E.; RUSSO, P.; PRIGENT, M.; THIÉRY, R. 2008. Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. Vet. Microbiol. 130: 69-79.

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

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

ENGVAL, E.; PERLMANN P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 8871-874.

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

EVERMANN, J.F.; BARRINGTON, G.M. 2005. Clinical features. **In:** Goyal, S.; Ridpath, J.F. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: diagnosis, management, and control.* Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp. 105-119.

EVERMANN, J. F. 2006. Pestiviral infection of llamas and alpacas. *Small Ruminant Res.* 61: 201-206.

FALCONE, E.; CORDIOLI, P.; TARANTINO, M.; MUSCILLO, M.; LA ROSA, G.; TOLLIS, M. 2003. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus in Italy. *Vet. Res. Común.* 27:485-94.

FAO. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Chile. Proyecto de Cooperación Técnica en Apoyo a la Crianza y Aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. [en línea]

<<http://www.rlc.fao.org/es/ganaderia/pdf/2914chi.pdf>> [consulta: 11-09-2008]

FELSENSTEIN, J. 1989. Phylip: phylogeny inference package. (version 3.5c). *Cladistics* 5: 164-166.

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

FLORES, E.; GIL, L.; BOTTON, S.; WEIBLEN, R.; RIDPATH, J.; KREUTZ, L.; PILATI, C.; DRIEMEYER, D.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A. 2000. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet. Microbiol.* 77: 175-183.

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

FOWLER, M. 1994. *Medicine and Surgery of South American Camelids*, 4th edition. Iowa State University Press.

FRASSER, G.; LITTLEJOHNS, I.; MOYLE, A. 1981. The isolation of a probable pestivirus from goat. *Aust. Vet. J.* 57: 197-198.

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

GARCIA, G. 1998. *Manejo de los ovinos.* Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Imprenta Antumapu. 117 p.

GARDINER, A.C.; BARLOW, R.M. 1981. Vertical transmission of border disease infection. *J. Comp. Path.* 91: 467-470.

GIANGASPERO, M.; HARASAWA, R. 2004. Genetic variety of bovine viral diarrhoea virus 2 strains isolated from sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 323-326.

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

- GRASSMANN, C.; ISKEN, O.; BEHRENS, S.** 1999. Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhoea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *Vet. Microbiol.* 73: 9196-9205.
- HAMEL, A. L., WASYLYSHEN, M. D., NAYAR, G. P. S.** 1995. Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus using RNA extracted directly from assorted specimens and a one tube reverse transcription PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 33: 287-291.
- HORZINECK, M.C.** 1990. Bovine virus diarrhoea: an introduction. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9(1): 13-23.
- HUGHES, A.; KERSHAW, G.; SHAW, I.** 1959. "B" or Border disease. An undescribed disease in sheep. *Vet. Rec.* 71: 313-317.
- HUNG, A.; LÓPEZ, T.; PERALES, R.; NOÉ, N.** 1988. Micoplasmosis en camélidos Sudamericanos. XI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Lima, Perú.
- HURTADO, A.; ADURIZ, G.; GOMEZ, N.; OPORTO, B.; JUSTE, R.; LAVIN, S.; LOPEZ, J.; MARCO, I.** 2004. Molecular identification of a new pestivirus associated with increased mortality in the Pyrenean Chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Spain. *J. of wildlife diseases.* 40: 796-800.
- HUSSIN, A.; WOLDEHIWET, Z.** 1994. Border disease virus: A review. *Vet Bull.* 64: 1131-1151.
- INE.** 2007a. Existencia de ganado en las explotaciones agropecuarias y forestales por especie, según región. [en línea]
<http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/censos_agropecuarios/xls/2007/12_rev.xls>
[consulta: 11-09-2008].
- INE.** 2007b. Evolución y perspectivas, Producción Pecuaria. Chile: período 2001-2006 y primer semestre 2007. [en línea]
<https://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/estadisticas_agropecuarias/pdf/pecuarioprimersemestre2007_2.pdf> [consulta: 11-09-2008].
- JACKOVA, A.; NOVACKOVA, M.; PELLETIER, C.; AUDEVAL, C.; GUENEAU, E.; HAFFAR, A.; PETIT, E.; REHBY, L.; VILČEK, Š.** 2008. The extended genetic diversity of BVDV-1: Typing of BVDV isolates from France. *Vet. Res. Commun.* 32: 7-11.
- JONES, L.; ZANDOMENI, R.; WEBER, L.** 2001. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Vet. Microbiol.* 81: 367-375.
- KIM, S.; ANDERSON, R.; YU, J.; ZYLICH, N.; KINDE, H.; CARMAN, S.; BEDENICE, D.; DUBOVI, E.** 2008. Genotyping and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from BVDV infected alpacas in North America. *Vet. Microbiol.* doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.029.
- KIMURA, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M.** 1994. MEGA: molecular evolutionary genetic analysis software for microcomputers. *Comp. Appl. Biosci.* 10: 189-191.
- 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.

LINDENBACH, B.; THIEL, H.J.; RICE, C.M. 2007. Flaviviridae: The viruses and their replication. **In:** Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.). *Fields Virology*, 5^o Edición. Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Philadelphia, Estados Unidos de Norteamérica. capítulo 33. 1101-1152.

LØKEN, T.; BJERKÅS, I.; HYLLSETH, B. 1982. Border disease in goats in Norway. *Res. Vet. Sci.* 33: 227-236.

LØKEN, T.; KROGSRUD, J.; BJERKÅS, I. 1991. Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated of vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J. Comp. Path.* 104: 195-209.

LØKEN, T. 2000. Border Disease in Goats. **In:** Tempesta M. (Ed.). *Recent Advances in Goat Diseases*. [en línea] <http://www.ivis.org/advances/Disease_Tempesta/Loken/ivis.pdf> [consulta: 25-09-2008].

MATTSON, D. 1994. Viral disease. Update on llama medicine. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 10: 345-351.

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

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

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

MEYERS, G.; EGE, A.; FETZER, C.; VON FREYBURG, M.; ELBERS, K.; CARR, V.; PRENTICE, H.; CHARLESTON, B.; SCHURMANN, E.M. 2007. Bovine viral diarrhoea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and Npro protease. *J. Virol.* 81: 3327-3338.

MEYLING, A. 1970. Demonstration of viral diarrhoea virus by the fluorescent antibody technique in tissues of cattle affected with bovine viral diarrhoea (mucosal disease). *Acta. Vet. Scand.* 11: 59-72.

MIGNON, B.; WAXWEILER, S.; THIRY, E.; BOULANGER, D.; DUBUISSON, J.; PASTORET P.P. 1992. Epidemiological evaluation of a monoclonal ELISA detecting bovine viral diarrhoea pestivirus antigens in field blood samples of persistently-infected cattle. *J. Virol. Meth.* 40: 85-94.

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

MISHRA, N.; DUBEY, R.; RAJUKUMAR, K.; TOSH, C.; TIWARI, A.; PITALE, S.; PRADHAN, H. 2007. Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolated from Indian goats (*Capra hircus*). *Vet. Microbiol.* 124: 340-347.

MISHRA, N.; RAJUKUMAR, K.; VILČEK, Š.; TIWARI, A.; SATAV, J.; DUBEY, S. 2008. Molecular characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolate originating from a native Indian sheep (*Ovis aries*). *Vet. Microbiol.* 130: 88-98.

- MOTHA, J.; THAM, K-M.** 1992. Pestivirus infection in a llama (*Lama glama*). N. Z. Vet. J. 40: 126.
- MÜLLER, C.** 2003. Aislamiento e identificación de pestivirus y herpesvirus obtenidos de ovinos y caprinos de Chile. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria.
- MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.S.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D.** (Eds.). 1995. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol. Suppl. 10: 415-427.
- MURPHY, F.; GIBBS, E.P.; HORZINECK, M.; STUDDERT, M.** 1999. Veterinary Virology. Third edition, Academic Press. EEUU.
- NAGAI, M.; HAYASHI, M.; SUGITA, S.; SAKODA, Y.; MORI, M.; MURAKAMI, T.; OZAWA, T.; YAMADA, N.; AKASHI, H.** 2004. Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhea viruses using five different genetic regions. Virus. Res. 99: 103-113.
- NAGAI, M.; HAYASHI, M.; ITOU, M.; FUKUTOMI, T.; AKASHI, H.; KIDA, H.; SAKODA, Y.** 2008. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhea virus genotype 1 isolated in Japan. Virus Genes. 36: 135-139.
- NETTLETON, P.F.** 1990. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 9: 131-150.
- NETTLETON, P.F.** 1991. Border Disease. Martin, W.B.; Aitken, I.D. Diseases of Sheep. 2° ed. Blackwell Scientific Publications, London.
- NETTLETON, P.F.; GILMOUR, J.S.; HERRING, J.A.; SINCLAIR, J.A.** 1992. The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 15: 179-188.
- ODEÓN, A.; KAISER, G.; DONIS, R.; RISATTI, G.; LEUNDA, M.** 1998. Isolation and molecular analysis of bovine viral diarrhea virus genotype II in Argentina. **In:** Proceedings of the XII Reunión Científico Técnica Asoc. Arg. Vet. Lab. Diagn. 12, p. 94.
- ODEÓN, A.; RISATTI, G.; KAISER, G.; LEUNDA, M.; ODRIOZOLA, E.; CAMPERO, C.; DONIS, R.** 2003. Bovine viral diarrhea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalizad dermatitis outbreaks in Argentina. Vet. Microbiol. 96: 133-144.
- ODEPA.** 2000. Clasificación de las explotaciones agrícolas del VI censo nacional agropecuario según tipo de productor y localización geográfica. [en línea] <<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/Explotaciones/explotaciones.pdf>>. [consulta: 30-09-2008].
- ODEPA.** 2005. Situación actual y perspectivas para 2005 en la producción de carne. [en línea] <www.odepa.gob.cl/webodepa/servlet/noticiasweb>. [consulta: 11-09-2008].
- OIE.** 2008. Bovine viral diarrhoea. **In:** Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). cap.2.4.8. [en línea] <http://www.oie.int/eng/Normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08_BVD.pdf>. [consulta: 11-09-2008].
- OLAFSON, P.; McCALLUM, A.; FOX, F.** 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. Cornell Vet. 36: 205-213.
- ORR, M.B.** 1987. Isolation of pestivirus in goat abortions. Surveillance. 14:13.

PARREÑO, V.; CONSTANTINI, V.; CHEETHAM, S.; BLANCO VIERA, J.; SAIF, L.J.; FERNANDEZ, F.; LEONI, L.; SCHUDEL, A. 2001. First isolation of rotavirus associated with neonatal diarrhoea in guanacos (*Lama guanicoe*) in the Argentinean Patagonia region. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health. 48: 713-20.

PARREÑO, V.; MARCOPPIDO, G. 2006. Estudio de la Sanidad en Camélidos: Avances a partir de la Obtención de Muestras de Camélidos Silvestres. **In:** Vilá, B (Ed). Investigación, Conservación y Manejo de Vicuñas. Proyecto Manejo Sostenido de Camélidos Silvestres (MACS). pp. 147-161.

PARSONSON, I.M.; O'HALLORAN, M.L.; ZEE, Y.C.; SNOWDON, W.A. 1979. The effects of bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD) virus on the ovine foetus. Vet. Microbiol. 4: 279-292.

PATON, D.J.; MCGOLDRICK, A.; GREASER-WILKE, I.; PARCHARIYANON, S.; SONG, J.Y.; LIU, P.P.; STADEJEK, T.; LOWINGS, J.P.; BJÖRKLUND, H.; BELAK, S. 2000. Genetic typing of classical swine fever virus. Vet. Microbiol. 73: 137-157.

PEARSON A. 1987. White liver disease and pestivirus infection in goat kids. Surveillance. 14:21.

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

PEREZ, P. 2005. Características de la producción ovina y caprina nacional. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, Depto. Fomento Producción Animal. 31p. (Serie Apuntes Docentes N° 20).

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

PRATELLI, A.; BOLLO, E.; MARTELLA, V.; GUARDA, F.; CHIOCCO, D.; BUONAVOGLIA, C. 1999. Pestivirus infection in small ruminants: virological and histopathological findings. New Microbiol. 22: 351-356.

PRATELLI, A.; MARTELLA, V.; CIRONE, F.; BUONAVOGLIA, C. 2001. Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in Southern Italy. J. Virol. Methods. 94: 81-85.

PUNTEL, M.; FONDEVILA, N.; BLANCO VIERA, J.; O'DONNELL V.; MARCOVECCHIO, J.; CARRILLO, B.; SCHUDEL, A. 1999. Serological Survey of Viral Antibodies in Llamas (*Lama glama*) in Argentina. J. Vet. Med. B. 46: 157.

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

RAMIREZ, A. 1987. Alpaca *Clostridium perfringens* Type A. Enterotoxemia: purification and assays of the enterotoxin. Tesis de grado PhD. Colorado State University. USA. 201p.

RAMIREZ, A. 1991. Enfermedades infecciosas en alpacas y llamas. Producción de rumiantes menores: Alpacas. 201-47.

RAMSEY, F.K.; CHIVERS, W.H. 1953. Mucosal disease of cattle. North. Am. Vet. 34: 629.

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

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

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.; BOLIN, S.R. 1998. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. Mol. Cell. Probe 12: 101-106.

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

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

RIVERA, H.; MADEWELL, B.R.; AMEGHINO, E. 1987. Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama pacos*). Am. J. Vet. Res. 48: 189-191.

RIVERA, H. 1993. El virus de la diarrea viral bovina. Investigaciones pecuarias. 6 (1) [en línea] <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/veterinaria/v06_n1/virusd.htm> [consulta: 23-09-2008].

ROEDER, P.L.; DREW, T.W. 1984. Mucosal disease of cattle: a late sequel to fetal infection. Vet. Rec. 114: 309-313.

SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.

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

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

SCHERER, C.; FLORES, E.; WEIBLEN, R.; CARON, L.; IRIGOYEN, L.; NEVES, J.; MACIEL, M. 2001. Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV-2): effects of the pregnancy and fetus. Vet. Microbiol. 79: 285-299.

SNOWDON, W.A.; FRENCH, E.L. 1975. The reaction of pregnant ewes to inoculation with mucosal disease virus of bovine origin. J. Comp. Pathol. 85: 224-251.

SOLIS HOSPINAL, R. 2000. Producción de Camélidos Sudamericanos. Segunda edición. Cerro de Pasco. Perú. 550p.

STADEJEK, T.; VILČEK, Š.; LOWINGS, J.P.; BALLAGI-PORDANY, A.; PATON, D.J.; BELAK, S. 1997. Genetic heterogeneity of classical swine fever virus in Central Europe. Virus Res. 52:195-204.

- STÅHL, K.; BENITO, A.; FELMER, R.; ZUÑIGA, J.; REINHARDT, G.; RIVERA, H.; BAULE, C.; MORENO-LÓPEZ, J.** 2009. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. *Pesqu. Vet. Bras.* 29: 41-44.
- SULLIVAN, D.; CHANG, G.J.; AKKINA, R.K.** 1997. Genetic characterization of ruminant pestiviruses: sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep. *Virus Res* 47:19-29.
- SWASDIPAN, S.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; PHILLIPS, N.; KIRKLAND, P.; MCGOWAN, M.** 2001. Rapid transplacental infection with bovine pestivirus following intranasal inoculation of ewes in early pregnancy. *Vet. Pathol.* 38: 275-280.
- TADICH, N.; NETTLETON, P. MORGAN, K.; HODGSON, A.; MACAULAY, R.; REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S.** 1998. Seroprevalencia de border disease en 22 ovejerías del sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 30: 191-196.
- TAJIMA, M.; FREY, H.R.; YAMATO, O.; MAEDE, Y.; MOENNING, V.; SCHOLZ, H.; GREISER-WILKE, I.** 2001. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Research.* 76: 31-42.
- TAJIMA, M.** 2004. Bovine viral diarrhoea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. *Vet. Microbiol.* 99:131-138.
- TAJIMA, M.; DUBOVI, E.** 2005. Genetic and clinical analyses of bovine viral diarrhoea virus isolates from dairy operations in the United States of America. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17:10-15.
- TAJIMA, M.** 2006. The prevalent genotypes of bovine viral diarrhoea virus in Japan, Germany and the United States of America. *Jpn. J. Vet. Res.* 54: 129-134.
- TERPSTRA, C.** 1981. Border disease: virus persistence, antibody response and transmission studies. *Res. Vet. Sci.* 30: 185-191.
- 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.
- THABTI, F.; LETELLIER, C.; HAMMAMI, S.; PÉPIN, M.; RIBIÈRE, M.; MESPLÈDE, A.; KERKHOFS, P.; RUSSO, P.** 2005. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch. Virol.* 150: 215-229.
- THEDFORD, T. R.; JOHNSON, L. W.** 1989. Infectious diseases of new-world camelids (NWC). *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 5:145-156.
- THIEL, H.; PLAGEMANN, P.; MOENNIG, V.** 1996. Pestiviruses. **In:** Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.). *Fields Virology*, 3^o Edición. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, Estados Unidos de Norteamérica.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.** 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
- TOPLAK, I.; SANDVIK, T.; BARLIC-MAGANJA, D.; GROM, J.; PATON, D.J.** 2004. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Vet. Microbiol.* 99: 175-85.
- TSUR, I.; HARMELIN, A.; DVIR, I.; YANAI, J.** 1996. Meningoencephalitis and brain abscessation due to *Escherichia coli* in a 2 week old alpaca cria. *Aust. Vet. J.* 74: 437-438.

- VALDAZO-GONZÁLEZ, B.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, M.; GREISER-WILKE, I.** 2006. Genetic typing and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain. *Vet. Microbiol.* 117: 141-153.
- VALDAZO-GONZÁLEZ, B.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, M.; SANDVIK, T.** 2007. Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *The Vet J.* 174: 316-324.
- VAN RIJN, P.; VAN GENNIP, H.; LEENDERTSE, C.; BRUSCHKE, C.; PATON, D.J.; MOORMAN, R.; VAN OIRSCHOT, J.** 1997. Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology.* 237: 337-348.
- VILČEK, Š.; HERRING, A.J.; HERRING, J.A.; NETTLETON, P.F.; LOWINGS, J.P.; PATON, D.J.** 1994. Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136: 309-323.
- VILČEK, Š.; STADEJEK, T.; BALLAGI-PORDANY, A.; LOWINGS, J.P.; PATON, D.J.; BELAK, S.** 1996. Genetic variability of classical swine fever virus. *Virus Res* 43:137-47.
- VILČEK, Š.; NETTLETON, P.; PATON, D.J.; BELÁK, S.** 1997. Molecular characterization of ovine pestivirus. *J. Gen. Virol.* 78: 725-735.
- VILČEK, Š.; PATON, D.; DURKOVIC, B.; STRONJNY, L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEGA, S.; SCICLUNA, M.; PAIFI, V.** 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146: 99-115.
- VILČEK, Š.; DURKOVIC, B.; BOBAKOVA, M.; SHARP, G.; PATON D.J.** 2002. Identification of bovine viral diarrhoea virus 2 in cattle in Slovakia. *Vet. Rec.* 151: 150-152.
- VILČEK, Š.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M.; GREISER-WILKE, I.; PATON, D.J.** 2004. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet. Res.* 35: 609-15.
- VILČEK, Š.; RIDHPATH, J.F.; VAN CAMPEN, H.; CAVENDER, J.L.; WARG, J.** 2005. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Research* 108: 187-193.
- WARD, G.M.** 1971. Experimental infection of pregnant sheep with bovine diarrhoea-mucosal disease virus. *Cornell Vet.* 61: 179-191.
- WENTZ, P.; BELKNAP, E.B.; BROCK, K.V.; COLLINS, J.K.; PUGH, D.G.** 2003. Evaluation of bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223: 223-228.
- WESTAWAY, E.G.; BRITON, M.A.; GALDAMOVICH, S.Y.; HORZINECK, M.C.; IGARASHI, A.; KAARIAINEN, L.; LVOV, D.K.; PORTERFIELD, J.S.; RUSSELL, P.K.; TRENT, D.W.** 1985. *Togaviridae*. *Intervirology.* 24: 125-139.
- XUE, W.; BLECHA, F.; MINOCHA, H.** 1990. Antigenic variations in bovine viral diarrhoea viruses detected by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1688-1693.
- ZAGHAWA, A.** 1998. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. *Zentralbl. Veterinarmed. [B].* 45: 345-351.

ANEXOS

ANEXO 1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas mediante el programa ClustalW.

CH920	TGTA-CACTGG-CCAATAAGGATACGTTAGCCACAACCGTTGTACGAACATACAAGAGAT	58
1025	TGTA-CACTGG-CCAATAAGGATACGTTAGCCACAACCGTTGTACGAACATACAAGAGAT	58
CH917	TGTA-CACTGG-CCAATAAGGATACGTTAGCCACAACCGTTGTACGAACATACAAGAGAT	58
CH918	TGGA-CACTGG-CCAATAAGGATACGTTAGCCACAACCGTTGTACGAACATACAAGAGAT	58
CH919	TGTA-CACTGG-CCAATAAGGATACGTTAGCCACAACCGTTGTACGAACATACAAGAGAT	58
113	TGTA-CACTGG-CCAATAAGGATACGTTAGCCACAACCGTTGTACGGACATACAAGAGAA	58
A474	TGTA-CACTGG-CCAATAAGGATACGTTAGCCACAACCGTTGTACGGACATACAAGAGAA	58
CH914	TGAA-CACTGG-CTAATAAGGATACGTTAGCCACAGCCGTTGTACGAACATACAAGAGAG	58
KE9	TGTA-CACTGG-CCAATAAGGATACGTTAGCCACAACCGTTGTACGAACGTACAAGAGGG	58
Osloss_BVDV1b_	TGTGTCACTGGTCCAATAAGGATACGTTAGCCATGACCGTTGTACGAACATACAAGAGGG	60
A391	TGTA-CACTGG-TCAATAAGGATACATTAGCCACAAGCATTGTGCGAACATACAAGAGAC	58
A415	TGTA-CACTGG-TCAATAAGGATACATTAGCCACAAGCATTGTGCGAACATACAAGAGAC	58
A291	TGTA-CACTGG-TCAATAAGGATACATTAGCCACAAGCATTGTGCGAACATACAAGAGAC	58
CP7_BVDV1b_	TGTA-CACTGG-CCAATAAGGATACGTTAGCCACAACCGTTGTACGAACATACAAGAGGG	58
NADL_BVDV1a_	TGTA-CGTTCAT-TCAATATGGACACCTTAGCCACAACCGTTGTGAGAACATACAAGAGGG	58
CH193	TGTA-CGTTCAT-TCAATATGGACACCTTAGCCACAACCGTTGTGAGAACATACAAGAGGG	58
CH888	TGTA-CGTTCAT-TCAATATGGACACCTTAGCCACAACCGTTGTGAGAACATACAAGAGGG	58
SD-1_BVDV1a_	TGTA-TGTTAG-CTAATAGGATACCTTAGACACAGCAGTAGTACGGACGTATAGGAGGT	58
CH916	TGTA-TGTTAG-CTAATAGGATACCTTAGACACAGCAGTAGTACGGACGTATAGGAGGT	58
1091	TGTA-TGTTAG-CTAATAGGATACCTTAGACACAGCAGTAGTACGGACGTATAGGAGGT	58
1068	TGTA-TGTTAG-CTAATAGGATACCTTAGACACAGCAGTAGTACGGACGTATAGGAGGT	58
CH921	TGTA-TGTTAG-CTAATAGGATACCTTAGACACAGCAGTAGTACGGACGTATAGGAGGT	58
Oregon_BVDV1a_	TGTA-TGTTAG-CTAATAGGATACCTTAGACACAGCAGTAGTACGGACGTATAGGAGGT	58
519/93_BVDV1c_	TGTA-TGCTAG-CCAATGAAGATACCTTAGACACAACCGTTGTAGTACAGACATATAGGAGGT	58
Deer-NZ1_BVDV1c_	TGTA-TGCTAG-CCAATGAAGATACCTTAGACACAACCGTTGTAGTACAGACATATAGGAGGT	58
C81	TGTG-TGTTAG-CTAATAGGATACCTTAGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
C1307	TGTG-TGT-AG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	57
O1326	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
O1388	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
O1730	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
A385	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
LL1084	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
A469	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
A1316	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
01360	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
O1564	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
A502	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
LL621	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
LL625	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
LL795	TGTG-TGTTAG-CTAGTAGGATACTCTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
LL1723	TGTG-TGTTAG-CTAGTAGGATACTCTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
LL1731	TGTG-TGTTAG-CTAGTAGGATACTCTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
LL793	TGTG-TGTTAG-CTAGTAGGATACTCTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
LL1732	TGTG-TGTTAG-CTAGTAGGATACTCTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
LL724	TGTG-TGTTAG-CTAACGAGGATACTCTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
O1348	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAAGAT	58
CH511	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGATGACGTACATAAGAT	58
Deer-GB1_BVDV1e_	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGACAGCTACAGAAGAT	58
KS86_BVDV1e_	TGTG-TGTTAG-CTAATGAGGATACTTTGGAGACAACAGTGGTGCTGACGTACATAGAT	58
1891/99_BVDV1g_	TGTG-CTCTAG-CCAACAAGGACACTTTGGACATAGCAGTGGTACGGACATACAAGAGGA	58
4998/89_BVDV1f_	TGCA-TGCTAG-CCAATGAGGACACCTTAGATTTGACCAAGGTACGGACATATAGGAGGA	58
22146/81_BVDV1f_	TGCA-CTTTAG-TCAATGAAGACACCTTGATACGACCAAGGTGCGGACTTATAGAAGGG	58
721/96_BVDV1d_	TGTA-CCCTAG-CTAATAAGGACACCTTAGATACGGCCGTTAGTGGGACGTATAGAAGGG	58
CH419	TGCG-CCCTAG-CGAACCAAGACACCTTTGGACACAACCGTTGTTAGGACATATAGAAGAA	58
CH476	TGCG-CCCTAG-CGAACCAAGACACCTTTGGACACAACCGTTGTTAGGACATATAGAAGAA	58
809	TGCA-CCCTAG-CGAACCAAGACACCTTTGGACACAACCGTTGTTAGGACATATAGAAGAA	58
693	TGCA-CCCTAG-CGAACCAAGACACCTTTGGACACAACCGTTGTTAGGACATATAGAAGAA	58
890_BVDV2a_	TGCA-CCCTGG-CGAACCAAGACACCTTAGACACAACCGTTGGTTAGGACATACAAGAGAA	58
104/98_BVDV2a_	TGCA-CCCTGG-TAAACCAAGACACCTTTGGATACAACCGTTGTTAGGACATACAAGAGAA	58
GI-1_BVDV2c_	TGCA-TCCTAG-CAAACCAAGACACCTTGATACAACCGTTTATTAGGACATATAGAAGAA	58
GI-6_BVDV2b_	TGCA-TCCAGG-CAAATCAAGACACTCTGGACACAACCGTTGTGACAGCAGTATAAAGAA	58
	** * * * * * * * * * *	
CH920	ACAAGCCTTTTCCTATAGGCAGGGCTGTATTACCCAGAAAACCATTTGGGGAAGACCTCT	118
1025	ACAAGCCTTTTCCTATAGGCAGGGCTGTATTACCCAGAAAACCATTTGGGGAAGACCTCT	118
CH917	ACAAGCCTTTTCCTATAGGCAGGGCTGTATTACCCAGAAAACCATTTGGGGAAGACCTCT	118
CH918	ACAAGCCTTTTCCTATAGGCAGGGCTGTATCACCAGAAAACCATTTGGGGAAGACCTCT	118
CH919	ACAAGCCTTTTCCTATAGGCAGGGCTGTATCACCAGAAAACCATTTGGGGAAGACCTCT	118
113	ACAAACCTTTTCCTATAGGCAGGGCTGCATTACCCAGAAAACCATTCGGGGAAGACCTCT	118
A474	ACAAACCTTTTCCTATAGGCAGGGCTGCATTACCCAGTTTTCATCGGGGAAGACCTCT	118

CH914 TCAAGCCTTTTCCTTATAGGCAGGGCTGTATTACCCAGAAAATCATTGGGGAAGACCTCT 118
 KE9 ACAAAACCTTTTCCTTATAGGCAGGGCTGCATTACCCAGAAAACCATTTGGGGAAGACCTCT 118
 Osloss_BVDV1b_ ACAGGCCCTTTCCCTTATAGGCAGGGCTGCATTACCCAGAAAAGTCATCGGGGAAGACCTCT 120
 A391 ACAAAACCTTTTCCTTATAGGCAGGGCTGCATTACCCAGAAAACCATTTGGGGAAGACCTCT 118
 A415 ACAAAACCTTTTCCTTATAGGCAGGGCTGCATTTCCTATAAAACCATTTGGGGAAGACCTCT 118
 A291 ACAAAACCTTTTCCTTATAGGCAGGGCTGCATTACCCAGTTTCCATTGGGGAAGACCTCT 118
 CP7_BVDV1b_ TCAGGCCCTTTCCCTATATAGGCAGGGCTGTGCATCACCAGAAAACCATCGGGGAAGACCTCT 118
 NADL_BVDV1a_ CTA AACCATTTCCCTCATAGGCAGGGCTGTATCACCAGAAAAGAACTCGGGGAGGATCTCC 118
 CH193 CTA AACCATTTCCCTCATAGGCAGGGCTGTATCACCAGAAAAGAACTCGGGGAGGATCTCC 118
 CH888 CTA AACCATTTCCCTCATAGGCAGGGCTGTATCACCAGAAAAGAACTCGGGGAGGATCTCC 118
 SD-1_BVDV1a_ CCGTACCATTCCCTATAGGCAGGGCTGTATCACCAGAAAACCTCGGGGAGGATCTCT 118
 CH916 CCGTACCATTCCCTATAGGCAGGGCTGTATCACCAGAAAACCTCGGGGAGGATCTCT 118
 1091 CCAGACCATTCCCTTATAGGCAGGGCTGTATCACCAGAAAACCTCGGGGAAGATCTCT 118
 1068 CCAGACCATTCCCTTATAGGCAGGGCTGTATCACCAGAAAACCTCGGGGAAGATCTCT 118
 CH921 CCAGACCATTCCCTTATAGGCAGGGCTGTATCACCAGAAAACCTCGGGGAGGATCTCT 118
 Oregon_BVDV1a_ CCAGACCATTCCCTTATAGGCAGGGCTGTATTACCCAGAAAAGACCTCGGGGAGGATCTCT 118
 519/93_BVDV1c_ CCA AACCATTTCCCTACAGACAAGGGCTGTATCACCAGAAAAGTCGTAGGGGAGGACCTCC 118
 Deer-NZ1_BVDV1c_ TCA AACCTTTCCCTTACAGACAAGGGCTGTATCACCAGAAAACCTCGTAGGAGAGGACCTCT 118
 C81 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 C1307 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 117
 O1326 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 O1388 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 O1730 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 A385 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 LL1084 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 A469 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 C1316 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 01360 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 O1564 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 A502 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 LL621 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 LL625 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATGTTG 118
 LL795 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGCTCTTC 118
 LL1723 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 LL1731 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 LL793 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 LL1732 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 LL724 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 O1348 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 CH511 CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 Deer-GB1_BVDV1e_ CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 KS86_BVDV1e_ CCAGGCCGTTCCCTCATAGGCAGGGCTGCATCACCATAAGATTTTGGGAGAGGATCTTC 118
 1891/79_BVDV1g_ CCAGGCCATTCCCTTATAGGCAGGGCTGCATAACCCAGAAAAGTTATAGGGGAAGACCTCC 118
 4998/89_BVDV1f_ CCAAGCCATTCCCTTACAGCAGGGGTTGTACCACACAAAAGTGGTAGGAGAAGATCTCT 118
 22146/81_BVDV1f_ CCA AACCGTACCCTTATAGCAGGGTGTGCATCAGCAGAAAAGTGGTAGGAGAAGACCTCT 118
 721/96_BVDV1d_ TTGTCCTATTCCCTAATAGGCAGGGTGTGTTACTCAAAAACCTTTTAGGGGAAGATCTCT 118
 CH419 CTACTCCATTTTCAGCAAAAATAATGGTGCACCTACGAAAAATAATAGGGGAAGATATCC 118
 CH476 CTACTCCATTTTCAGCAAAAATAATGGTGCACCTACGAAAAATAATAGGGGAAGATATCC 118
 809 CTACTCCATTTTCAGCAAAAATAATGGTGCACCTACGAAAAATAATAGGGGAAGATATCC 118
 693 CTACTCCATTTTCAGCAAAAATAATGGTGCACCTACGAAAAATAATAGGGGAAGATATCC 118
 890_BVDV2a_ CTACTCCATTTTCAGCGGAGAAAATGGTGCCTATGAAAAATAATAGGGGAAGATATCC 118
 104/98_BVDV2a_ CTACCCCATTTCCAGCGGAGAAAATGGTGTGCTATGAAAAAGTGAAGGGGAAGACATCC 118
 GI-1_BVDV2c_ CCACCCCATTTCCAGCGGAGAAAATGGTGTGCTATGAAAAATAATAGGGGAAGATATCC 118
 GI-6_BVDV2b_ CCACTCCATTTCCAGCGGAGAAAGTGGTGTGCTATGAAAAGGCTTTTAGGGGAAGACATCT 118

* * * * *

CH920 ACGACTGTGCCTTGGGAGGGAATTGGACTTGTGTGCCGGGGATCAACTACGATATGTGG 178
 1025 ACGACTGTGCCTTGGGAGGGAATTGGACTTGTGTGCCGGGGATCAACTACGATATGTGG 178
 CH917 ACGACTGTGTCTTGGGAGGGAATTGGACTTGTGTGCCGGGGATCAACTACGATATGTGG 178
 CH918 ACGACTGTGCCTTGGGAGGGAATTGGACTTGTGTGCCGGGGATCAACTACGATATGTGG 178
 CH919 ACGACTGTGCCTTGGGAGGGAATTGGACTTGTGTGCCGGGGATCAACTACGATATGTGG 178
 113 ACGACTGTGCCTTGGGAGGGAATTGGACTTGCCTGCCGGGGATCAACTACAATATGTGG 178
 A474 ACGACTGTGCCTTGGGAGGGAATTGGACTTGCCTGCCGGGGATCAACTACAATATGTGG 178
 CH914 ACGACTGTGCCTTGGGAGGGAATTGGACTTGTGTGCCGGGGATCAACTACGATATGTAG 178
 KE9 ACGACTGTGTCTTGGGAGGGAATTGGACTTGTGTGCCGGGGATCAACTACGATATGTGG 178
 Osloss_BVDV1b_ ACGACTGTGCCTTGGGAGGGAATTGGACTTGTGTGCCGGGGATCAACTACGATATGTAG 180
 A391 ATAGCTGTGATTTAGGAGGGAATTGGACTTGTGTGAAGGGGGATCAGCTGCGATATGTTG 178
 A415 ATAGCTGTGATTTAGGAGGGAATTGGACTTGTGTGAAGGGGGATCAGCTGCGATATGTTG 178
 A291 ATAGCTGTGATTTAGGAGGGAATTGGACTTGTGTGAAGGGGGATCAGCTGCGATATGTTG 178
 CP7_BVDV1b_ ACGACTGTGCCTTAGGAGGGAATTGGACTTGTGTGCCGGGGATGCACTACGATATGTAG 178
 NADL_BVDV1a_ ATA AACTGCATCCTTGGAGGAAATTGGACTTGTGTGCCTGGAGACCAACTACTATACAAG 178
 CH193 ATA AACTGCATCCTTGGAGGAAATTGGACTTGTGTGCCTGGAGACCAACTACTATACAAG 178
 CH888 ATA AACTGCATCCTTGGAGGAAATTGGACTTGTGTGCCTGGAGACCAACTACTATACAAG 178
 SD-1_BVDV1a_ ATGACTGTGCCCTCGGAGGAAATTGGACTTGCCTGACTGGGACCACTCAGATACACAG 178
 CH916 ATGACTGTGCCCTCGGAGGAAATTGGACTTGCCTGACTGGGACCACTCAGATACACAG 178
 1091 ATA AATGTGAATTGGAGGAAATTGGACTTGTGTGATTGGGACCACTACAATACACAG 178
 1068 ATA AATGTGAATTGGAGGAAATTGGACTTGTGTGATTGGGACCACTACAATACACAG 178

CH921 ATAATTTGGAACCTGGAGGAAATGGACTTGTGTGACTGGGGACCAGCTACAATACACAG 178
Oregon_BVDV1a_ ATGACTGTATTCTTGGAGGAAACTGGACTTGTGTAACTGGGGACCAACTACAATACACAG 178
519/93_BVDV1c_ ATGACTGTACCCCTGGAGGAAACTGGACATGTGTAGTGGGGGACCAACTACGATACACAG 178
Deer-NZ1_BVDV1c_ ATGACTGCATCCTTGGAGGAAATGGACATGTGTAGAAGGGGAGCAACTAAAATACACAG 178
C81 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
C1307 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 177
O1326 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
O1388 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
O1730 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
A385 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
LL1084 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
A469 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
C1316 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
O1360 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
O1564 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
A502 ATGACTGTAGCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
LL621 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
LL625 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
LL795 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
LL1723 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
LL1731 ATGACTGTATCCTCGGAGGTTTCTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
LL793 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
LL1732 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
LL724 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
O1348 ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
CH511 ATGACTGTAGCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
Deer-GB1_BVDV1e_ ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
KS86_BVDV1e_ ATGACTGTATCCTCGGAGGAAACTGGACTTGTGTAGCAGGAGAAACAGCTGCAATATGCAG 178
1891/99_BVDV1g_ ATGACTGTATCCTTGGGGGAAATGGACTTGTGTGGCAGGAAACCAACTGGAGTATGCTG 178
4998/89_BVDV1f_ ACACCTGCATATTAGGAGGCAACTGGACGTGTATCGTGGGGGACCAGTTGAGATATACAG 178
22146/81_BVDV1f_ ACTCCTGTGATCTGGGAGGTAATGGACATGCATTCAGGAGAGCAGCTAAAATACGCAG 178
721/96_BVDV1d_ ATGACTGCATCCTTAGGAGGAAACTGGACGTGTATAGTAGGGGATCAGCTACGTTACACAG 178
CH419 ATGAATGCATTCCTAGGTGAAACTGGACATGCATAAAGTGGTACCATAGCAGGTTGAAAG 178
CH476 ATGAATGCATTCCTAGGTGAAACTGGACATGCATAAAGTGGTACCATAGCAGGTTGAAAG 178
809 ATGAATGCATTCCTAGGTGAAACTGGACATGCATAAAGTGGTACCATAGCAGGTTGAAAG 178
693 ATGAATGCATTCCTAGGTGAAACTGGACATGCATAAAGTGGTACCATAGCAGGTTGAAAG 178
890_BVDV2a_ ATGAATGCATTCCTGGGTGAAACTGGACATGCATAAAGTGGTACCATAGCAGGTTGAAAG 178
104/98_BVDV2a_ ATGAATGCATTCCTAGGTGAAACTGGACATGCATAAAGTGGTACCATAGCAGGTTGAAAG 178
GI-1_BVDV2c_ ATGAATGCATTCCTGGGTGAAACTGGACATGCATAAAGTGGCGCCACAGCAAGTTGAAAG 178
GI-6_BVDV2b_ ATGAGTGTGACCTAGGCGGAAACTGGACATGCATAAAGTGGTACCATAGTAAATTTGAAAG 178
* ** ** ** * ** * ** *

CH920 ATGGCCCTGTGCAATCATGCAAGTGGTGTGGTTACAAGTTTGATAAAAAGTGAGGGTCTGC 238
1025 ATGGCCCGTGTGCAATCATGCAAGTGGTGTGGTTACAAGTTTGATAAAAAGTGAGGGTCTGC 238
CH917 ATGGCCCTGTGCAATCATGCAAGTGGTGTGGTTACAAGTTTGATAAAAAGTGAGGGTCTGC 238
CH918 ATGGCCCTGTGCAATCATGCAAGTGGTGTGGTTACAAGTTTGATAAAAAGTGAGGGTCTGC 238
CH919 ATGGCCCTGTGCAATCATGCAAGTGGTGTGGTTACAAGTTTGATAAAAAGTGAGGGTCTGC 238
113 ATGGCCCTGTGCAAGTGTGGTTACAAGTTTGATAAAAAGTGAGGGTCTGC 238
A474 ATGGCCCTGTGCAAGTGTGGTTACAAGTTTGATAAAAAGTGAGGGTCTGC 238
CH914 ACGGCCCTGTGCAAGTGTGGTTACAAGTTTGATAAAAAGTGAGGGTCTGC 238
KE9 GTGGCCCGTGTGCAAGTGTGGTTACAAGTTTGATAAAAAGTGAGGGTCTGC 238
Oslloss_BVDV1b_ ATGGCCCTGTGCAAGTGTGGTTACAAGTTTGATAAAAAGTGAGGGTCTGC 240
A391 ATGGTCCAGTGTGCAAGTGTGGTTATAAGTTTTTAAAAGTAAAGGTTCTGC 238
A415 ATGGTCCAGTGTGCAAGTGTGGTTATAAGTTTTTAAAAGTAAAGGTTCTGC 238
A291 ATGGTCCAGTGTGCAAGTGTGGTTATAAGTTTTTAAAAGTAAAGGTTCTGC 238
CP7_BVDV1b_ CTGGGCCCTGTGAGTCTGTGAGTGTGGTTACAAGTTTAAAAGTAAAGGTTCTGC 238
NADL_BVDV1a_ GGGGCTCTATTGAATCTTGAAGTGGTGTGGCTATCAATTTAAAGAGAGTGAGGGACTAC 238
CH193 GGGGCTCTATTGAATCTTGAAGTGGTGTGGCTATCAATTTAAAGAGAGTGAGGGACTAC 238
CH888 GGGGCTCTATTGAATCTTGAAGTGGTGTGGCTATCAATTTAAAGAGAGTGAGGGACTAC 238
SD-1_BVDV1a_ GAGGCCTTATCGAATCCTGTAAGTGGTGTGGTTATAAATTTCAAAAAGTGAGGGGTTAC 238
CH916 GAGGCTTATCGAATCCTGTAAGTGGTGTGGCTATAAATTTCAAAAAGTGAGGGGTTAC 238
1091 GGGGCTCTATCGAATCTTGAAGTGGTGTGGCTATAAATTTCAAAAAGTGAGGGGTTAC 238
1068 GGGGCTCTATCGAATCTTGAAGTGGTGTGGCTATAAATTTCAAAAAGTGAGGGGTTAC 238
CH921 GGGGCTCTATCGAATCTTGAAGTGGTGTGGCTATAAATTTCAAAAAGTGAGGGGTTAC 238
Oregon_BVDV1a_ GAGGCTCTGTTGAATCTTGAAGTGGTGTGGTTTTAAATTTCAAAAAAATGAGGGACTAC 238
519/93_BVDV1c_ GGGGTACATCGAATCATGCAAGTGGTGTGGTTACAGATTCCTAAAGGTTGAGGGGCTAC 238
Deer-NZ1_BVDV1c_ GGGGTACATCGAATCATGCAAGTGGTGTGGTTACAGATTCCTAAAAAATGAGGGACTAC 238
C81 GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC 238
C1307 GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC 237
O1326 GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC 238
O1388 GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC 238
O1730 GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC 238
A385 GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC 238
LL1084 GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC 238
A469 GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC 238
C1316 GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC 238
O1360 GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC 238

O1564	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
A502	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
LL621	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
LL625	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
LL795	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
LL1723	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
LL1731	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
LL793	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
LL1732	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
LL724	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
O1348	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
CH511	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
Deer-GB1_BVDV1e_	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
KS86_BVDV1e_	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
1891/79_BVDV1g_	GGGGCCCAATTGAACACTGCAAGTGGTGTGGTTACAAATTTTTTCAGTAGTGAAGGACTAC	238
4998/89_BVDV1f_	GGGGCCCTATTGAGACTTGTAAAGTGGTGTGGCCACAATTTTAGAAAGAAAGAACCTAC	238
22146/81_BVDV1f_	GGGGCCCAATTGAGACTTGTAAAGTGGTGTGGCCACAATTTTCAGAAAGAAAGAACCTAC	238
721/96_BVDV1d_	GGGGTACCATTGAATCCTGCAAGTGGTGTGGCTACAAGTCTTGAAGAGTGAAGGGTTAC	238
CH419	ACGGACCTATTAAGAAGTGTAAAGTGGTGTGGCTATGACTTCGTCAACTCAGAGGGACTGC	238
CH476	ACGGACCTATTAAGAAGTGTAAAGTGGTGTGGCTATGACTTCGTCAACTCAGAGGGACTGC	238
809	ACGGACCTATTAAGAAGTGTAAAGTGGTGTGGCTATGACTTCGTCAACTCAGAGGGACTGC	238
693	ACGGACCTATTAAGAAGTGTAAAGTGGTGTGGCTATGACTTCGTCAACTCAGAGGGACTGC	238
890_BVDV2a_	ACGGACCTATCAAGAAATGTAAGTGGTGTGGCTATGACTTCGTCAACTCAGAGGGACTGC	238
104/98_BVDV2a_	ATGGGCCTATCAAAAAGTGTAAAGTGGTGTGGATACGACTTCTTCAACTCAGAGGGACTGC	238
GI-1_BVDV2c_	ATGGGCCTATTAAGAAGTGTAAAGTGGTGTGGCTATGACTTCTCAAGCCAGAGGGGCTGC	238
GI-6_BVDV2b_	ATGGGCCTATCAAGAAATGTAAGTGGTGTGGCTATGAATTTTTCCAGCTCAGAGGGACTAC	238
	* * * * *	
CH920	CTCACTTCCCAATTGGCAAGTGCAGCTGAAGAATGAAAGTGGCTACAGGCAAGTAGATG	298
1025	CTCACTTCCCAATTGGCAAGTGCAGCTGAAGAATGAAAGTGGCTACAGGCAAGTAGATG	298
CH917	CTCACTTCCCAATTGGCAAGTGCAGCTGAAGAATGAAAGTGGCTACAGGCAAGTAGATG	298
CH918	CTCACTTCCCAATTGGCAAGTGCAGCTGAAGAATGAAAGTGGCTACAGGCAAGTAGATG	298
CH919	CTCACTTCCCAATTGGCAAGTGCAGCTGAAGAATGAAAGTGGCTACAGGCAAGTAGATG	298
113	CTCACTTCCCAATTGGCAAGTGCAGCTGAAGAATGAAAGTGGCTACAGGCTAGTAGATG	298
A474	CTCACTTCCCAATTGGCAAGTGCAGCTGAAGAATGAAAGTGGCTACAGGCTAGTAGATG	298
CH914	CTCACTTCCCAATTGGCAAGTGCAGCTGAAGAATGAAAGTGGCTACAGGCAAGTAGACG	298
KE9	CTCACTTCCCAATTGGCAAGTGCAGCTGAAGAATGAAAGTGGCTACAGCAAGTGGACG	298
Oslloss_BVDV1b_	CACACTTCCCAATTGGCAAGTGCAGCTGAAGAATGAAAGTGGCTACAGCAAGTAGATG	300
A391	CACATTTCCCGATTGGCAAGTGCAGCTGAAGAATGAGAGTGGCTATAGACAGGTGGATG	298
A415	CACATTTCCCGATTGGCAAAATGCAAGCTGAAGAATGAGAGTGGCTATAGACAGGTGGATG	298
A291	CACATTACCCAATTGGCAAAATGCAAACTGAAGAATGAGAAATGGCTATAGACAGGTGGATG	298
CP7_BVDV1b_	CGCATTTCCCAATCGGCAAAATGCAAGCTGAAGAATGAGAGTGGCTATAGACAAAGTGGATG	298
NADL_BVDV1a_	CACACTACCCCAATTGGCAAGTGTAAATTTGGAGAACGAGACTGGTTACAGGCTAGTAGACA	298
CH193	CACACTACCCCAATTGGCAAGTGTAAATTTGGAGAACGAGACTGGTTACAGGCTAGTAGACA	298
CH888	CACACTACCCCAATTGGCAAGTGTAAATTTGGAGAACGAGACTGGTTACAGGCTAGTAGACA	298
SD-1_BVDV1a_	CGCACTACCCATTTGGTAAAGTGTAGGTTGAATAATGAAACTGGCTACAGATTAGTAGATG	298
CH916	CGCACTACCCATTTGGTAAAGTGTAGGTTGAATAATGAAACTGGCTACAGATTAGTAGATG	298
1091	CACACTACCCATTTGGCAAGTGTAAAGTTGAAGAATGAGACTGGTTATAGAATTTAGACA	298
1068	CACACTACCCATTTGGCAAGTGTAAAGTTGAAGAATGAGACTGGTTATAGAATTTAGACA	298
CH921	CACACTACCCATTTGGCAAGTGTAAAGTTGAAGAATGAGACTGGTTATAGAATTTAGACA	298
Oregon_BVDV1a_	CACACTACCCCAATTGGCAAGTGTAGGTTGAAGAACGAGACTGGCTACAGATTCTGGATG	298
519/93_BVDV1c_	CACATTACCCGATTGGCAAGTGTAAAGCTAGAGAATGAGACTGGCTACAGGCTAGTGGATG	298
Deer-NZ1_BVDV1c_	CACATTACCCGATTGGCAAGTGTAAAGCTGGAGAACGAGACTGGCTACAGGTTAGTGGATG	298
C81	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
C1307	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	297
O1326	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
O1388	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
O1730	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
A385	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
LL1084	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
A469	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
C1316	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
O1360	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
O1564	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
A502	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
LL621	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
LL625	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
LL795	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
LL1723	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
LL1731	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
LL793	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
LL1732	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
LL724	CGCACTACCCCAATTGTCAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
O1348	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
CH511	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACA	298
Deer-GB1_BVDV1e_	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACG	298
KS86_BVDV1e_	CGCACTACCCCAATTGGCAAAATGTAAACTAGAGAATGAGACAGGTTACAGGTTGGTTGACA	298

1891/99_BVDV1g_ CACATTACCCAATTGGA AAAATGCAGGCTGAGAAACGAGACTGGCTACAGACTGGTAGATA 298
 4998/89_BVDV1f_ CACACTACCCCAATTGGTAAGTGCAGGCTAAAAAATGAGACAGGCTACCGACTAGTAGATG 298
 22146/81_BVDV1f_ CACACTACCCCAATTGGCAAGTGCAGGTTGAAAGAATGAGACTGGTACCGACTAGTAGATG 298
 721/96_BVDV1d_ CACACTATCCAATTGGCAAAATGCAGGTTAAAAAATGAGACTGGCTACAGGTTGGTAGACG 298
 CH419 CACACTACCCCAATAGGTAAGTGCATGCTCATGAATGAGAGTGGGTACAGGTATGTAGATG 298
 CH476 CACACTACCCCAATAGGTAAGTGCATGCTCATGAATGAGAGTGGGTACAGGTATGTAGATG 298
 809 CACACTACCCCAATAGGTAAGTGCATGCTCATGAATGAGAGTGGGTACAGGTATGTAGATG 298
 693 CACACTACCCCAATAGGTAAGTGCATGCTCATGAATGAGAGTGGGTACAGGTATGTAGATG 298
 890_BVDV2a_ CACACTACCCCAATAGGTAAGTGCATGCTCATCAATGAGAGTGGGTACAGGTATGTAGATG 298
 104/98_BVDV2a_ CACACTACCCCAATAGGTAAGTGCATGCTTAGCAATGAGAGTGGGTACAGACATGTAGATG 298
 GI-1_BVDV2c_ CACACTACCCCAATAGGTAAGTGCATGCTCAGCAATGAGGTTGGGTACAGGTATGTAGATG 298
 GI-6_BVDV2b_ CACACTACCCCAATAGGTAAGTGTATGCTCAATAACGAGAGTGGGTACAGGTACGTAGATG 298
 * * * * *

CH920 AGACCTCTTGCAACAGAGACGGGTGGCTATAGTACCATCAGGTTTTTTGAAATGCAAGA 358
 1025 AGACCTCTTGCAACAGAGACGGGTGGCTATAGTACCATCAGGTTTTTTGAAATGCAAGA 358
 CH917 AGACCTCTTGCAACAGAGACGGGTGGCTATAGTACCATCAGGTTTTTTGAAATGCAAGA 358
 CH918 AGACCTCTTGCAACAGAGACGGGTGGCTATAGTACCAACAGGTTGGTAAATGCAAGA 358
 CH919 AGACCTCTTGCAACAGAGACGGGTGGCTATAGTACCAACAGGTTGGTAAATGCAAGA 358
 113 AGACCCCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTGCCATCAGGATTAGTGAAATGCAAAA 358
 A474 AGACCTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTGCCATCAGGATTAGTGAAATGCAAAA 358
 CH914 AGACCTCTTGCAACAGAGACGGTGTGGCTATAGTGCCATCAGGTTTTAGTGAAATGCAAGA 358
 KE9 AGACCTCTTGTAACAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCACTGGTGGTAAATGCAAGA 358
 Osloss_BVDV1b_ AGACCTCTTGCAACAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCACTGGTTCGGTAAATGCAAGA 360
 A391 AGACTTATGCAACAGAGATGGTGTGGCCATAGTGCCATCTGGCTGGTGGCATGCAAGA 358
 A415 AGACTTATGCAACAGAGATGGTGTGGCCATAGTGCCATCTGGCTGGTGGCATGCAAGA 358
 A291 AAACCTTATGCAACAGAGACGGTGTGGCCATAGTGACATCTGGCTGGTAAATGCAAGA 358
 CP7_BVDV1b_ AGACTTCTTGCAACAGAAACGGCGTGGCTATAGTGCCATCTGGCACGGTCAAATGCAAGA 358
 NADL_BVDV1a_ GTACCTCTTGCAATAGAGAAAGGTGTGGCCATAGTACCACAAGGGACATTAAGTGAAGA 358
 CH193 GTACCTCTTGCAATAGAGAAAGGTGTGGCCATAGTACCACAAGGGACATTAAGTGAAGA 358
 CH888 GTACCTCTTGCAATAGAGAAAGGTGTGGCCATAGTACCACAAGGGACATTAAGTGAAGA 358
 SD-1_BVDV1a_ ACACCTCTTGCGACAGAGAAAGGTGTGGCCATAGTACCACATGGGCTGGTAAAGTGAAGA 358
 CH916 ACACCTCTTGCGACAGAGAAAGGTGTGGCCATAGTACCACATGGGCTGGTAAAGTGAAGA 358
 1091 ACACCTCTTGCAATAGAGAAAGCGTGGCCATAGTACCACAAGGGCTGGTAAATGTAAGA 358
 1068 ACACCTCTTGCAATAGAGAAAGCGTGGCCATAGTACCACAAGGGCTGGTAAATGTAAGA 358
 CH921 ACACCTCTTGCAATAGAGAAAGCGTGGCCATAGTACCACAAGGGCTGGTAAATGTAAGA 358
 Oregon_BVDV1a_ GTACCTCTTGCAACAGAGAAAGGTGTGGCCATAGTGCCACAAGGACTGGTAAAGTGAAGA 358
 519/93_BVDV1c_ ACACCTCTTGCAATAGGACGGTGTGGCCATAGTACCACAGGGGACAGTAAATGCAAGA 358
 Deer-NZ1_BVDV1c_ ACACCTCTTGCAACAGGATGGGCTGGCCATAGTAAACACAGGGGACGGTAAATGCAAGA 358
 C81 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 C1307 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 357
 O1326 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 O1388 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 O1730 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 A385 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 LL1084 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 A469 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 C1316 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 O1360 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 O1564 GTACATCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 A502 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 LL621 TTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 LL625 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 LL795 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGCACCACACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 LL1723 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGCACCACACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 LL1731 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGCACCACACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 LL793 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGCACCACACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 LL1732 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGCACCACACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 LL724 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGCACCACACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 O1348 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 CH511 GTACGTCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGGCCTTAAATGCAAGA 358
 Deer-GB1_BVDV1e_ GTACATCTTGCAATAGAGACGGTGTGGCTATAGTACCAACTGGGACCTTAAATGCAAGA 358
 KS86_BVDV1e_ GCACATCTTGTAATAGGGATGGTGTGGCCATAGTACAACATGGGGTTCTTAAATGCAAGA 358
 1891/99_BVDV1g_ ACACCTCTTGTAATAGAGAGGGCGTAGCCATAGTGCCAACTGGAACAATGAAATGCAAGA 358
 4998/89_BVDV1f_ ATACCACCTGTAACAGAGATGGTGTGGCTATAGTGCCATCTGGAACACTTAAATGCAAGA 358
 22146/81_BVDV1f_ ACACCTCTTGCAATGTTGGATGGCGTAGCCATAGTGCCAAATGGACTGGTGAAGTGAAGA 358
 721/96_BVDV1d_ ACACCTCTTGCGATAGGGGTGGTGTAGCCATAGTTCCAACAGGCACCGTAAAGTGTAGAA 358
 CH419 ACACCTCTTGCGATAGGGGTGGTGTAGCCATAGTTCCAACAGGCACCGTAAAGTGTAGAA 358
 CH476 ACACCTCTTGCGATAGGGGTGGTGTAGCCATAGTTCCAACAGGCACCGTAAAGTGTAGAA 358
 809 ACACCTCTTGCGATAGGGGTGGTGTAGCCATAGTTCCAACAGGCACCGTAAAGTGTAGAA 358
 693 ACACCTCTTGCGATAGGGGTGGTGTAGCCATAGTTCCAACAGGCACCGTAAAGTGTAGAA 358
 890_BVDV2a_ ACACCCCTTGCGATAGGGGTGGCGTAGCCATAGTTCCAACAGGCACCGTAAAGTGTAGAA 358
 104/98_BVDV2a_ ACACCCCTTGCGATAGGGGTGGCGTAGCCATAGTTCCAACAGGCACCGTAAAGTGTAGAA 358
 GI-1_BVDV2c_ ACACCTCTTGCGATAGGGGTGGTGTGGCTATAGTTCCAACAGGCACCGTAAAGTGTAGAA 358
 GI-6_BVDV2b_ ACACCTCTTGCGACAGAGATGGTGTGGCCATAGTTCCAACAGGCACCGTAAAGTGTAGAA 358
 * * * * *

CH920	TAGGGAACACAGTAGTGCAAGTTATAGC	386
1025	TAGGGAACACAGTAGTGCAAGTTATAGC	386
CH917	TAGGGAACACAGTAGTGCAAGTTATAGC	386
CH918	TAGGGAACCCAGTAGTGCAAGTTATAGC	386
CH919	TAGGGAACACAGTAGTGCAAGTTATAGC	386
113	TAGGGAACACAGTAGTGCAAGTTATAGC	386
A474	TAGGGAACACAGTAGTGCAAGTTATAGC	386
CH914	TAGGGAACACAGTGGTGCAAGTAATAGC	386
KE9	TAGGGAACACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
Osloss_BVDV1b_	TAGGGGACACAGTGGTGCAAGTCATAGC	388
A391	TAGGGGACACAGTAGTGCAAGTCATTGC	386
A415	TAGGGGACACAGTAGGTGCAGTCATTGC	386
A291	TAGGGGACACAGTGGTGCAAGTCATTGC	386
CP7_BVDV1b_	TAGGGGACACGGTGGTGCAAGTCATTGC	386
NADL_BVDV1a_	TAGGAAAACAACCTGTACAGGTCATAGC	386
CH193	TAGGAAAACAACCTGTACAGGTCATAGC	386
CH888	TAGGAAAACAACCTGTACAGGTCATAGC	386
SD-1_BVDV1a_	TAGGGGACACAACCTGTACAGGTCATAGC	386
CH916	TAGGGGACACAACCTGTACAGGTCATAGC	386
1091	TAGGGGACACAATCATAACAGGTCATAGC	386
1068	TAGGGGACACAATCATAACAGGTCATAGC	386
CH921	TAGGGGACACAATCATAACAGGTCATAGC	386
Oregon_BVDV1a_	TAGGAGACACAATTGTACAGGTCATAGC	386
519/93_BVDV1c_	TAGGAGATACGGTTGTACAGGTTATTGC	386
Deer-NZ1_BVDV1c_	TAGGAGATGTGGTCGTACAGGTCGTTGC	386
C81	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCACAGC	386
C1307	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCACAGC	385
O1326	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCACAGC	386
O1388	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCACAGC	386
O1730	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCACAGC	386
A385	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCACAGC	386
LL1084	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCACAGC	386
A469	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCACAGC	386
C1316	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCACAGC	386
O1360	TAGCGGATACAGTGGTGCAATGTCACAGC	386
O1564	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCACAGC	386
A502	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCACAGC	386
LL621	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
LL625	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
LL795	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
LL1723	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
LL1731	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
LL793	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
LL1732	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
LL724	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
O1348	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCGTTAGC	386
CH511	TAGCGGATACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
Deer-GB1_BVDV1e_	TAGGGGATACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
KS86_BVDV1e_	TAGGGGACACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
1891/99_BVDV1g_	TAGGGGACACTGTGGTGCAAGTCATAGC	386
4998/89_BVDV1f_	TAGGAGACACAGTGGTGCAAGTCATAGC	386
22146/81_BVDV1f_	TAGGGGATACAGTGGTTACAGTTATAGC	386
721/96_BVDV1d_	TTGGAGACACGCTGGTGCAAGTCGTTGC	386
CH419	TAGGTAACGTCACGGTGCAAGTTATCGC	386
CH476	TAGGTAACGTCACGGTGCAAGTTATCGC	386
809	TAGGTAACGTCACGGTGCAAGTTATCGC	386
693	TAGGTAACGTCACGGTGCAAGTTATCGC	386
890_BVDV2a_	TAGGTGACGTCACGGTGCAAGTTGTCGC	386
104/98_BVDV2a_	TAGGCAATGTTACGGTGCAAGTTATTGC	386
GI-1_BVDV2c_	TAGGCAATGTCACGGTACAGGTTATCGC	386
GI-6_BVDV2b_	TTGGGAATGCCACAGTACAGGTTATCGC	386

* * * ** **