



**UNIVERSIDAD DE CHILE**



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN ANTIGÉNICA DE AISLADOS DEL VIRUS  
DIARREA VIRAL BOVINA OBTENIDOS DE ALPACAS (*Lama  
pacos*) Y LLAMAS (*Lama glama*) CON AISLADOS DE VIRUS  
DIARREA VIRAL BOVINA OBTENIDOS DE BOVINOS Y  
CEPAS DE REFERENCIA MEDIANTE REACCIÓN DE  
NEUTRALIZACIÓN RECÍPROCA

**PATRICIA MACARENA QUEZADA PARRAGUEZ**

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

PROFESOR GUÍA: MARÍA ORFELIA CELEDÓN VENEGAS

Financiamiento Proyecto FONDECYT 1080130

SANTIAGO, CHILE  
2011



# UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

## COMPARACIÓN ANTIGÉNICA DE AISLADOS DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA OBTENIDOS DE ALPACAS (*Lama pacos*) Y LLAMAS (*Lama glama*) CON AISLADOS DE VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA OBTENIDOS DE BOVINOS Y CEPAS DE REFERENCIA MEDIANTE REACCIÓN DE NEUTRALIZACIÓN RECÍPROCA

### PATRICIA MACARENA QUEZADA PARRAGUEZ

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

NOTA FINAL: .....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: MARÍA CELEDÓN VENEGAS	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO:	CARLOS NUÑEZ P.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO:	JOSÉ PIZARRO L.	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2011

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

*Dedico esta memoria de  
título a mi familia y  
amigos, gracias por su  
constante apoyo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todos los que integran el Laboratorio de Virología de la facultad, profesores, funcionarios y compañeros, por su cordialidad, simpatía, cooperación, disposición y hospitalidad, y por procurar un grato y distendido ambiente de trabajo durante todo el período que involucró la ejecución de esta memoria, haciendo mucho más agradable y expedita la tarea.

De forma especial, quisiera agradecer a la Dra. María Orfelía Celedón por su asesoría, dirección y entrega de conocimientos, y, en especial, por su amabilidad y comprensión en cada momento.

Además, extendiendo mis agradecimientos a todas las personas y entidades que hicieron posible la realización exitosa de esta memoria. Al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, a los docentes y memoristas que participaron en la recolección e identificación de los aislados virales utilizados en este estudio, a la institución que financia esta investigación, y a los que de uno u otro modo participaron en el proyecto.

## ÍNDICE

	<b><u>Página</u></b>
I.- INTRODUCCIÓN .....	1
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
1.1.- CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS (CSA) .....	3
1.2.- VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) .....	7
Taxonomía .....	8
Estructura y propiedades físicas .....	9
Genoma .....	9
Multiplicación .....	10
Variabilidad genómica .....	11
Variabilidad antigénica .....	12
Variabilidad biológica .....	13
Hospederos y reservorios .....	14
Infección en bovinos .....	16
Infección en camélidos sudamericanos (CSA) .....	21
Control de la enfermedad .....	24
III.- HIPÓTESIS .....	27
IV.- OBJETIVO GENERAL .....	27
V.- OBJETIVO ESPECÍFICO .....	27
VI.- MATERIAL Y MÉTODOS .....	28
Muestras .....	28
Preparación del "stock" de virus .....	30
Titulación del virus .....	31
Prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IPI) .....	31
Elaboración de sueros hiperinmunes .....	32
Titulación de anticuerpos neutralizantes .....	33
Determinación de diferencias antigénicas .....	33
VII.- RESULTADOS .....	35
VIII.- DISCUSIÓN .....	44
IX.- CONCLUSIÓN .....	51
BIBLIOGRAFÍA .....	52
ANEXOS .....	68

## ÍNDICE DE CUADROS

	<u>Página</u>
<b>Cuadro N° 1:</b> Identificación y procedencia de aislados del virus diarrea viral bovina (VDVB) obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos (alpacas y llamas) de la Región Metropolitana (1998-2002).	29
<b>Cuadro N° 2:</b> Identificación y procedencia de aislados del virus diarrea viral bovina (VDVB) obtenidos de bovinos de la Región Metropolitana y de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins (1993-2007).	30
<b>Cuadro N° 3:</b> Títulos de anticuerpos neutralizantes en reacción de seroneutralización cruzada entre cepas y aislados del virus diarrea viral bovina (VDVB).	36
<b>Cuadro N° 4:</b> Número de diluciones de diferencia en los títulos de anticuerpos entre la reacción homóloga y las reacciones heterólogas de cada uno de los sueros preparados contra las distintas cepas y aislados del virus diarrea viral bovina (VDVB).	37
<b>Cuadro N° 5:</b> Promedio de los títulos de anticuerpos neutralizantes en reacciones de seroneutralización cruzada entre cepas y aislados de distintos genotipos y subgrupos del virus diarrea viral bovina (VDVB).	38
<b>Cuadro N° 6:</b> Coeficiente de similitud antigénica (R) entre cepas y aislados de los distintos genotipos y subgrupos del virus diarrea viral bovina (VDVB).	42
<b>Cuadro N° 7:</b> Valores promedio del coeficiente de similitud antigénica (R) entre distintos genotipos y subgrupos del virus diarrea viral bovina (VDVB).	43

## RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza infectando a animales silvestres y domésticos del orden Artiodactyla. Es el agente causal del complejo diarrea viral bovina/enfermedad de las mucosas, ocasiona enfermedad digestiva y respiratoria, es inmunosupresor y genera importantes pérdidas económicas asociadas a problemas reproductivos como pérdida embrionaria, abortos, mortinatos, defectos congénitos y el nacimiento de animales persistentemente infectados (PI). Presenta una gran variabilidad genómica; dos genotipos (VDVB-1 y VDVB-2), y varios subgrupos genómicos dentro de cada genotipo, han sido identificados. Existen dos biotipos, citopático (CP) y no citopático (NCP), y aunque no presentan serotipos, existen varias variantes antigénicas del virus.

En esta memoria se buscó establecer si se manifiestan diferencias significativas a nivel antigénico entre cepas de referencia (NADL, Singer y Oregon) del subgrupo 1a del VDVB-1 y aislados virales de diferentes genotipos y subgrupos del VDVB (VDVB-1b, VDVB-1e y VDVB-2a) recolectados de 3 bovinos, 6 alpacas y 5 llamas de la Zona Central de Chile, y que provenían de rebaños sanos y de rebaños con antecedentes de signos clínicos atribuibles a la enfermedad (abortos, mortinatos, y muerte en adultos). Los aislados de alpacas y llamas corresponden a virus de los subgrupos 1b y 1e del genotipo 1 del VDVB (VDVB-1b y VDVB-1e), y al subgrupo 2a del genotipo 2 (VDVB-2a); mientras que los aislados de bovinos pertenecen a los subgrupos VDVB-1b y VDVB-1e. Para determinar el grado de similitud antigénica entre los aislados y cepas de los distintos subgrupos se realizaron pruebas de neutralización cruzada, empleando antisueros policlonales (elaborados en conejos). Mediante el cálculo del coeficiente de similitud antigénica (R) se pudo detectar la presencia de diferencias antigénicas significativas entre aislados de subgrupos distintos, mientras que los ubicados dentro de un mismo subgrupo mostraron valores de R indicativos de similitud antigénica en casi todos los casos, excepto en la combinación de un virus de alpaca y uno de bovino, ambos del subgrupo 1b, que mostraron diferencias antigénicas significativas.

## SUMMARY

The bovine viral diarrhea virus (BVDV) belongs to the genus *Pestivirus* of the family *Flaviviridae*. It's found widely distributed in nature infecting wild and domestic animals of the order Artiodactyla. Is the causative agent of the bovine viral diarrhea/mucosal disease complex, causes digestive and respiratory disease, is immunosuppressive, and generates significant economic losses associated with reproductive problems such as embryonic loss, abortions, stillbirths, congenital defects and the birth of persistently infected (PI) animals. It presents a great genomic variability; two genotypes (BVDV-1 and BVDV-2), and several genomic subgroups within each genotype, have been identified. There are two biotypes, cytopathic (CP) and noncytopathic (NCP); and although the virus does not present serotypes, several antigenic variants of the virus exist.

This memory is intended to establish whether significant differences in the antigenic level are present between reference strains (NADL, Singer and Oregon) of subgroup 1a of BVDV-1 and viral isolates of different genotypes and subgroups of BVDV (BVDV-1b, BVDV-1e and BVDV-2a) collected from 3 cows, 6 alpacas and 5 llamas of the Central Zone of Chile, that came from healthy flocks and herds with history of clinical signs attributable to the disease (abortions, stillbirths, and death in adults). Isolates of alpacas and llamas are viruses from the subgroups 1e and 1b of BVDV genotype 1 (BVDV-1b and BVDV-1e), and from the subgroup 2a of BVDV genotype 2 (BVDV-2a), whereas bovine isolates belong to subgroups BVDV-1b and BVDV-1e. To determine the degree of antigenic similarity among isolates and strains of the different subgroups, cross-neutralization assays using polyclonal antisera (produced in rabbits) were executed. Using the coefficient of antigenic similarity (R) was possible to detect the presence of significant antigenic differences between isolates from different subgroups, while those located within the same subgroup showed R values indicative of antigenic similarity in almost all cases, except in the combination of a virus from an alpaca and one from a cow, both of subgroup 1b, which showed significant antigenic differences.

## I.- INTRODUCCIÓN

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un patógeno de gran importancia en la producción bovina de Chile y el mundo, ya que produce importantes pérdidas económicas en la industria ganadera. Es el agente causal del complejo diarrea viral bovina (DVB)/enfermedad de las mucosas (EM), participa en el complejo respiratorio bovino, y es responsable de la ocurrencia de diferentes cuadros clínicos de variable intensidad y gravedad. Ocasiona problemas de fertilidad, malformaciones congénitas, abortos, muerte perinatal y el nacimiento de terneros persistentemente infectados, principales responsables de la diseminación del virus en el rebaño. Independiente del cuadro clínico, es un agente inmunodepresor por lo que predispone a otras infecciones virales y bacterianas.

El VDVB es un pestivirus de la familia *Flaviviridae*. Se describe un solo serotipo con variantes antigénicas y dos biotipos definidos por su capacidad de producir efecto citopático *in vitro*. El análisis genético de regiones del genoma del virus ha permitido identificar dos genotipos, VDVB-1 y VDVB-2, y varios subgrupos en cada genotipo, que entre otras funciones, estarían asociados a la variabilidad antigénica que presentan los distintos aislados virales.

En Chile, estudios serológicos en el ganado bovino denotan una amplia difusión del virus con prevalencias mayores a un 60%, y el análisis genómico de aislados ha evidenciado la presencia de los dos genotipos y varios subgrupos del VDVB-1. La presencia del virus también se ha detectado en camélidos sudamericanos domésticos (CSD) introducidos en la Región Metropolitana; sin embargo, la búsqueda de animales sero-reaccionantes y el aislamiento viral en camélidos sudamericanos (CSA) ubicados en el altiplano chileno han dado resultados negativos. Aislados del VDVB obtenidos de rebaños de CSA clínicamente sanos y de rebaños que han sufrido enfermedades graves, atribuibles a infección con VDVB, demuestran la presencia de dos subgrupos del VDVB-1 (subgrupos 1b y 1e) y sólo un subgrupo del VDVB-2 (subgrupo 2a) en alpacas y llamas.

En el país no se tiene un programa oficial de control de la infección. No obstante, los productores de ganado bovino aplican vacunas con el fin de controlar las pérdidas reproductivas

asociadas al virus. Las vacunas disponibles están confeccionadas con uno o los dos genotipos, pero contienen sólo un subgrupo de cada uno. Además, su eficacia en la prevención de la enfermedad y en la protección fetal resulta debatible.

El presente estudio pretende establecer, mediante pruebas de seroneutralización cruzada, si existen diferencias antigénicas significativas entre diferentes genotipos y subgrupos del VDVB aislados de CSA, con relación a los diferentes genotipos y subgrupos de aislados nacionales de bovinos, y un subgrupo de las cepas virales corrientemente empleadas en la fabricación de vacunas comerciales. Y de tal manera, tener una aproximación de la variabilidad antigénica de los aislados del VDVB presentes en bovinos, llamas y alpacas de Chile. Además, permite obtener una noción, por lo menos desde el punto de vista experimental *in vitro*, del efecto que tienen las diferencias antigénicas entre los distintos aislados y las cepas de referencia del VDVB sobre el control (vacunas) y diagnóstico de la enfermedad, lo que resulta de importancia debido a que son las cepas comúnmente empleadas para estos fines.

## II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.- CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS (CSA)

Los "Camélidos Sudamericanos" (CSA) o "Camélidos del Nuevo Mundo" son mamíferos pertenecientes al orden Artiodactyla, suborden Tylopoda, familia Camelidae, tribu Lamini que incluye a los géneros *Lama* y *Vicugna* (Linnaeus, 1758; Müller, 1776; Molina, 1782). Tienen su origen en América del Norte durante el Plioceno (Franklin, 1982) y hacia el final de este período, hace unos 3 millones de años, migraron a América del Sur (Webb, 1974), donde se adecuaron a zonas áridas y semiáridas adoptando funciones anátomo-fisiológicas especializadas para combatir el estrés termal, la deshidratación, y la hipoxia producida por altura (Wheeler, 1991). Se clasifican en camélidos sudamericanos silvestres (CSS) que involucran a dos especies la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*), y camélidos sudamericanos domésticos (CSD) constituidos por la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Lama pacos*) (Linnaeus, 1758; Müller, 1776; Molina, 1782).

Evidencias arqueológicas indican que la domesticación de llamas y alpacas ocurrió alrededor del año 4000 a.C. en la zona altiplánica de Perú. Del proceso de caza de animales silvestres se derivó a un proceso de explotación de los animales domésticos, lo que permitió a las comunidades aborígenes proveerse de fibra, carne, cueros, combustible (heces) y medicinas (piedras bezoares o cálculos intestinales) (Bonacic, 1991).

En Sudamérica, los CSA se encuentran distribuidos principalmente en Perú (3.599.775 cabezas), Bolivia (2.359.006 cabezas), Argentina (737.100 cabezas), Chile (229.038 cabezas) y Ecuador (10.269 cabezas) (FIA, 2000). Forman manadas numerosas que pastan en las alturas llanas de los Andes a 3.500 a 5.000 m.s.n.m.; zonas que se caracterizan por tener condiciones medioambientales muy adversas durante todo el año, como son una oscilación térmica muy alta, una concentración de oxígeno más baja y una presión atmosférica de alrededor de 40% menos que el valor observado a nivel del mar (Sánchez, 2004). Existen poblaciones, en número no significativo, en Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y algunos países europeos como el Reino

Unido, Alemania, Italia, Francia y España producto de la importación de animales; empleándolos principalmente para la producción de fibra o como animales de compañía (Sumar, 1997; Brown, 2000; Pinto *et al.*, 2010).

Los CSA presentan características diferenciales y únicas como son: ausencia de cuernos o astas, presencia de verdaderos caninos separados de los premolares por diastemas, anatomía de las piernas traseras que le permite descansar sobre el vientre con las rodillas dobladas y los garrones hacia atrás, presencia de almohadilla digital en lugar de cascos, presencia de glándulas metatarsianas, labio leporino, organización social polígama, utilización social de estercoleros, ausencia de dimorfismo sexual, y ovulación inducida con una sola cría al parto (Wheeler, 1991). Tienen una vida productiva de aproximadamente 14 años, aunque viven más de 20 años, y son aptos para la reproducción a los dos años (Rossi, 2004).

Los CSD son usados como animales de carga y son fuente de fibra y de carne, condición que los hace indispensables para la subsistencia de un amplio sector de la población alto andina, destacándose su eficiencia en el uso de la tierra en un ambiente adverso como lo son las frágiles praderas de los páramos andinos, donde se alimentan de pastos naturales que crecen a esa altitud y cuya disponibilidad está sometida a los cambios estacionales; sin embargo, los camélidos se adaptan a estas condiciones ambientales depositando capas de grasa subcutánea, muscular y retroperitoneal durante la época húmeda, que movilizan en las épocas de escasez (Fowler, 1998; FAO, 2005a). Además, los CSA tienen una alta eficiencia digestiva con alimentos de baja calidad, la que se relaciona al mayor tiempo de retención del alimento en su tracto digestivo ya que regurgitan y vuelven a masticar el forraje que ingieren, como hacen los rumiantes, pero son mucho más eficientes que éstos en la extracción de proteína y energía. En cuanto a la anatomía y fisiología del aparato digestivo presentan: labio leporino, que confiere a estos animales una ventaja para asir y recolectar forraje con gran eficiencia; incisivos que se ubican oblicuamente y tienen un crecimiento continuo, que les permite seguir recolectando forraje eficazmente a pesar del paso de los años, favoreciendo su longevidad; y un estómago que posee tres compartimentos denominados C1, C2 y

C3 que no son análogos a los pre-estómagos de rumiantes (Fowler, 1998; Sponheimer *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2010).

En Chile, la Región de Arica y Parinacota y la Región de Tarapacá concentran el 90,1% de las llamas (71.524 cabezas) y el 89,1% de las alpacas (40.341 cabezas) (INE, 2007). En el resto de las regiones los porcentajes no superan el 2% de la participación total, excepto la Región de Antofagasta que posee un 6,86% de las llamas (FIA, 2000). En cuanto a los CSS, la totalidad de la población de vicuñas (25.000 cabezas aprox.) se distribuye en el ecosistema de puna, compitiendo con alpacas y llamas en la obtención de sus recursos nutricionales; mientras que el guanaco, cuya población es de 73.000 a 86.000 cabezas, se muestra como una especie más cosmopolita distribuyéndose naturalmente a lo largo de todo el territorio nacional, aún cuando la mayor parte de los individuos se concentran en la Región de Magallanes y de la Antártica Chilena (FAO, 2005a). La participación porcentual de los CSD en la masa total de ganado existente en Chile es apenas un 1%, en tanto que el mayor porcentaje corresponde a bovinos (38%), seguido por ovinos (34%), porcinos (16%), caprinos (7%), y el 4 % restante a equinos, mulares y asnales (INE, 1997). De las cifras totales de CSD aproximadamente el 25% corresponde a machos y el 75% a hembras. La cantidad de crías y adultos varía según la fuente de información, sin embargo, se estima que en promedio existe un 19% de crías (animal de 0-1 año) y un 81% de adultos (FIA, 2000).

Los criadores de CSD en Chile son, en su mayoría, campesinos aymaras adaptados a las duras condiciones de vida que les impone el altiplano de las Regiones de Arica y Parinacota y de Tarapacá. La mayor parte de las explotaciones son unidades familiares y tanto en Chile como en el resto de Sudamérica no han sido objeto de innovaciones tecnológicas significativas. Prevalecen los métodos tradicionales, los que además de dar como resultado una baja producción de fibra y de carne, van conduciendo al deterioro de los recursos naturales como consecuencia del deficiente manejo de los pastizales (FIA, 2000). En otras regiones del país donde se han introducido camélidos, la producción se encuentra asociada a campesinos que se han dedicado a la ganadería de pequeños rumiantes y a pequeños agricultores (FAO, 2005a).

Como se ha indicado anteriormente, la crianza de alpacas y llamas es una actividad económica relevante para las regiones andinas, destacando la producción de fibra, especialmente la de alpaca que posee una alta valoración en los mercados internacionales por ser de fina textura, suave, liviana, de gran poder aislante, con propiedades higroscópicas, buena resistencia y elasticidad, suave al manejo, de colores naturales y brillante a la vista (Cardellino y Mueller, 2008; FAO, 2005a). El peso promedio del vellón de alpaca es de 2,6 kilos y el de llamas es de 1,53 kilos en un lapso interesquila de 2,3 años (Cardellino y Mueller, 2008).

En relación a la producción de carne, se estima que el precio de un animal en pie es de 25.000 a 35.000 pesos, en vara se paga entre 750 y 850 pesos/kilo, y en corte 1.000 a 2.750 pesos/kilo. En el caso de las llamas y alpacas se obtienen, aproximadamente, 44 y 29 kilos en vara, respectivamente (FIA, 2000). Sin embargo, tanto la carne de llama como la de alpaca poseen un consumo bajísimo en los medios urbanos, pese a poseer extraordinarias cualidades nutritivas como un 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 (FAO, 2005a).

Desde el punto de vista de su comportamiento reproductivo, los CSA presentan características peculiares: las hembras no presentan ciclos estrales definidos, se muestran en estado de receptividad sexual continua y la ovulación es inducida por el coito, pero no por un estímulo físico del tracto genital sino por un potente factor seminal, cuya absorción se ve favorecida por la eyacuación intrauterina y por las erosiones que se producen debido a larga duración de la monta (30 a 50 minutos) (Adams *et al.*, 2005). La gestación se desarrolla en más del 90% de los casos en el cuerno uterino izquierdo pese a que ambos ovarios son igualmente activos en el aporte de óvulos, la placenta es de tipo epiteliocorial y difusa, y el período de gestación es largo (342-350 días), lo que resulta en el nacimiento de la cría en un estado avanzado de desarrollo y con una mayor posibilidad de sobrevivencia en un medio inhóspito como el alto andino (Brown, 2000; FAO, 2005b; Pinto *et al.*, 2010). Todos los camélidos tienen en común el mismo número diploide de cromosomas ( $2n=74$ ), por lo que las especies de CSA pueden cruzarse entre sí generando híbridos fértiles (Fowler, 1998).

El manejo sanitario es rudimentario y sólo de tipo curativo. Según los productores, las enfermedades más frecuentes son la sarna en los adultos y la enterotoxemia en las crías (FIA, 2005a).

Debido a que algunos productos obtenidos de CSA, como la fibra, la carne y el cuero, muestran interesantes perspectivas de mercado, en los últimos años se ha tratado de impulsar el desarrollo de esta ganadería, lo que ha llevado a un aumento en la frecuencia de transporte de animales desde sus lugares de origen a diferentes regiones del país, generándose la posibilidad de que se infecten con agentes provenientes de otras especies, a la vez que ellos pueden servir como reservorio (Evermann, 2006). Al respecto, recientes investigaciones en países donde se han introducido CSD señalan que la infección con VDVB es de relevancia, ya que se encuentra asociada a enfermedad respiratoria y digestiva, y a pérdidas reproductivas (Belknap *et al.*, 2000; Goyal *et al.*, 2002; Carman *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009).

## **1.2.- VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB)**

El VDVB es un patógeno de distribución mundial con prevalencias serológicas en bovinos que fluctúan entre un 12% (Msolla *et al.*, 1988) y un 89% (Bolin *et al.*, 1985a). Es de gran importancia en la industria ganadera ya que genera sustanciales pérdidas económicas asociadas a un rendimiento reproductivo sub-óptimo debido a infertilidad, muerte embrionaria, abortos, retardo en el crecimiento prenatal, mortinatos, defectos congénitos, retardo en el crecimiento postnatal, y muerte por enfermedad de las mucosas (Malmquist, 1968; Ward *et al.*, 1969; Duffell *et al.*, 1986). Además, es responsable de numerosos síndromes clínicos, incluyendo infecciones agudas con enfermedad respiratoria y digestiva (Childs, 1946; Olafson *et al.*, 1946; Ramsey y Chivers, 1953; Potgieter *et al.*, 1984), e inmunodepresión, favoreciendo el desarrollo de otros patógenos y conllevando a la producción de diferentes enfermedades (Lee y Gillespie, 1957; Richer *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 2000; Haines *et al.*, 2001).

La enfermedad diagnosticada como diarrea viral bovina (DVB) se presentó por primera vez en el año 1946 en Estados Unidos (Olafson *et al.*, 1946), y se caracterizó por la presentación de fiebre alta, depresión, diarrea, deshidratación, anorexia, salivación, descarga nasal, erosiones gastrointestinales, leucopenia, y hemorragia en varios tejidos. El agente causal de esta enfermedad fue aislado por Lee y Gillespie, (1957) y se denominó VDVB. Una presentación similar pero de mayor severidad se observó en Canadá (Childs, 1946) y Estados Unidos, manifestándose con fiebre, anorexia, depresión, salivación profusa, descarga nasal, hemorragias gastrointestinales, erosiones, úlceras, y diarrea profusa a veces sanguinolenta; condición que posteriormente se denominó "enfermedad de las mucosas" (EM) (Ramsey y Chivers, 1953). La etiología de la EM permaneció desconocida hasta que logró ser reproducida experimentalmente, determinándose que el VDVB era el agente causal de la enfermedad (Brownlie *et al.*, 1984; Bolin *et al.*, 1985b).

### **Taxonomía**

El VDVB pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* (Heinz *et al.*, 2000). Anteriormente, los pestivirus estaban clasificados como parte de la familia *Togaviridae* (Westaway *et al.*, 1985), pero debido a similitudes en la organización genómica y estrategias de replicación con los flavivirus (Collett *et al.*, 1988a) se hizo necesaria la reclasificación de estos virus dentro de la familia *Flaviviridae* (Horzinek, 1991). La familia *Flaviviridae* (del latín *flavus*, amarillo) actualmente está constituida por tres géneros: los *Flavivirus*, los *Pestivirus* (del latín *pestis*, plaga), y los *Hepacivirus* (del griego *hepar*, *hepatus*, hígado) (Heinz *et al.*, 2000).

El género *Pestivirus* actualmente contiene cuatro especies aceptadas: el virus de la diarrea viral bovina-1 (VDVB-1), el VDVB-2, el virus de la fiebre porcina clásica (VFPC), y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) de las ovejas. Además, se incluye una especie tentativa representada por un sólo pestivirus aislado de una jirafa ("giraffe") (Heinz *et al.*, 2000; Becher y Thiel, 2002).

## **Estructura y propiedades físicas**

El virión de los pestivirus corresponde a una partícula esférica de 40 a 60 nm de diámetro con una cápside central electrón-densa de aproximadamente 30 nm y una envoltura lipídica donde se insertan tres glicoproteínas: E<sup>rns</sup>, E1 y E2 (Horzinek *et al.*, 1971; Murphy, 1980; Lindenbach *et al.*, 2007). El peso molecular estimado del virión del VDVB es de  $6 \times 10^7$  y su densidad de flotación en sacarosa es de 1,10 a 1,15 g/cm<sup>3</sup> (Heinz *et al.*, 2000). La envoltura lipídica, que deriva de las membranas de las células infectadas, hace a estos virus susceptibles a la inactivación con solventes orgánicos y detergentes (Ridpath, 2005a). La infectividad no se ve afectada por el congelamiento, pero disminuye a temperaturas superiores a los 40°C (Heinz *et al.*, 2000). Otros métodos de inactivación incluyen el tratamiento con tripsina (0,5 mg/ml a 37°C por 60 minutos) (Liess, 1990), etilenamina (reducción de 5 log<sub>10</sub> unidades usando 10 mmol/l a 37°C por 2 horas) (Preuss *et al.*, 1997), irradiación de haz de electrones (4,9 y 2,5 kGy son necesarios para reducir la infectividad viral en un log<sub>10</sub> en muestras congeladas y líquidas, respectivamente) (Preuss *et al.*, 1997), e irradiación gamma (20–30 kGy) (Miekka *et al.*, 1998).

A diferencia de los flavivirus que son rápidamente inactivados a un pH bajo, los pestivirus pueden sobrevivir en un rango de pH relativamente amplio (5,7–9,3) (Hafez y Liess, 1972; Lindenbach *et al.*, 2007). Otra diferencia con el resto de los géneros dentro de la familia *Flaviviridae* es que en los pestivirus la envoltura lipídica que rodea a los viriones es pleomórfica (Ridpath, 2005a; Ridpath, 2010).

## **Genoma**

El genoma de los pestivirus está compuesto de ARN de hebra simple de polaridad positiva de una longitud aproximada de 12,3 kb y no presenta ARNm subgenómicos (Collett *et al.*, 1988b; Meyers *et al.*, 1989; Becher, *et al.*, 1998; Avalos-Ramirez *et al.*, 2001). Contiene un gran "open reading frame" (ORF) flanqueado por las regiones no traducidas (NTR) 5' (372 a 385 nucleótidos) y 3' (185 a 273 nucleótidos) (Collett *et al.*, 1988b; Brock *et al.*, 1992; Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Lindenbach *et al.*, 2007). El extremo 5' carece de estructura "cap", mientras que el extremo 3' no

se encuentra poliadenilado y termina con un corto tracto poli C (Moormann y Hulst, 1988; Brock *et al.*, 1992; Deng y Brock, 1993). El ORF codifica una sola gran poliproteína de cerca de 4.000 kDa, la que será dividida, posterior a la traducción, en proteínas individuales mediante la acción de proteasas virales y celulares (Ridpath, 2005a). La disposición genómica es en el siguiente orden: la proteína no estructural N<sup>pro</sup> (N terminal autoproteasa), luego las proteínas estructurales de la cápsula (Proteína C) y envoltura (E<sup>ms</sup>, E1 y E2), y las siguientes son proteínas no estructurales (p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Thiel *et al.*, 1996). La N<sup>pro</sup> es propia de los pestivirus y no tiene una contraparte en otros virus pertenecientes a la familia *Flaviviridae* (Lindenbach *et al.*, 2007).

### **Multiplicación**

La unión y entrada de los pestivirus a la célula involucra la interacción con un receptor, la internalización y la fusión de membranas (Lindenbach *et al.*, 2007). Los receptores de la célula para pestivirus no han sido completamente caracterizados, pero mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se identifica a una proteína de superficie celular de 50 kDa (Xue y Minocha, 1993) y a otras de 60 y 93 kDa (Schelp *et al.*, 1995).

Las glicoproteínas E2 y E<sup>ms</sup> pueden ligarse independientemente a la superficie celular, interactuando con distintos componentes de la membrana celular (Hulst y Moormann, 1997). La glicoproteína E2 es la proteína mayoritariamente presente en el virión y es la principal responsable de la unión al receptor celular y del tropismo del virus en cultivos celulares, por lo menos para los pestivirus de rumiantes (Hulst y Moormann, 1997; Liang *et al.*, 2003). Además, es la proteína más inmunodominante existente en el virión de los pestivirus, induciendo altos niveles de anticuerpos neutralizantes (Donis y Dubovi, 1987; Donis *et al.*, 1988; Bolin y Ridpath, 1990).

Luego de la unión, el VDVB ingresa a la célula vía endocitosis (Krey *et al.*, 2005; Lecot *et al.*, 2005), ubicándose en un compartimiento endocítico prelisosomal en donde un pH bajo induce la fusión de la envoltura del virión con la membrana celular, llevando a que la nucleocápside se libere hacia el citoplasma, lugar en que ocurre la traducción y duplicación del ARN genómico. La traducción del ARN es independiente del Cap y está mediado por una secuencia nucleotídica

conocida como IRES (del inglés, Internal Ribosome Entry Site) que está ubicada en el extremo 5' UTR del genoma y permite comenzar la traducción del ARN uniéndose a la subunidad ribosomal 40S generando la producción de una poliproteína que posteriormente es fraccionada en proteínas no estructurales y estructurales, iniciándose este proceso por la proteína no estructural N<sup>pro</sup>. El conjunto de proteínas no estructurales se ensamblan en un complejo funcional de replicación y ayudan a catalizar la transcripción de ARN sentido positivo a una hebra ARN complementaria sentido negativo, la que a su vez sirve de plantilla para generar nuevos ARN genómicos. Este proceso se realiza en el citoplasma celular vecino al retículo endoplásmico. Las proteínas virales son procesadas por proteasas virales y celulares para generar proteínas virales maduras. Las proteínas de la cápside son liberadas de la membrana del retículo endoplásmico e interactúan con ARN genómicos seguido por el reconocimiento de dominios citoplasmáticos de proteínas de la envoltura. Los viriones dispuestos en vesículas se movilizan a través del citoplasma a la superficie, donde las vesículas se fusionan con la membrana plasmática liberando las partículas en el medio extracelular alrededor de las 8 horas post infección (Lindenbach *et al.*, 2007).

### **Variabilidad genómica**

Una característica distintiva del VDVB es su gran diversidad genómica, lo que ha llevado a separar a los VDVB en dos especies distintas: el VDVB genotipo 1 (VDVB-1) y VDVB genotipo 2 (VDVB-2). Esta diversidad se asocia a una alta frecuencia de mutaciones puntuales y recombinaciones genéticas, existiendo diferencias de hasta un 40% en las secuencias nucleotídicas de algunas regiones del genoma (Ridpath y Bolin, 1991; Ridpath *et al.*, 1994; Ridpath, 2010). Las variaciones se pueden encontrar a lo largo de todo el genoma (Ridpath y Bolin, 1995), pero tienen mayor significancia biológica en algunas regiones que en otras (Ridpath, 2010).

Las regiones genómicas empleadas para la detección de diferencias genotípicas corresponden a la región no traducida 5' NTR, a la región de la proteína no estructural (NS) N<sup>pro</sup> y a la región que codifica a la glicoproteína E2 (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Becher *et al.*, 1997, 1999, 2003; Van Rijn *et al.*, 1997). La región 5' NTR es la más comúnmente empleada para

la detección y caracterización del virus debido a que es la región más conservada (Ridpath, 2010). Por el contrario, la región más variable es la que codifica para la proteína E2, esto hace que la variación antigénica sea particularmente pronunciada entre cepas de VDVb-1 y VDVb-2 (Becher *et al.*, 2003).

El análisis filogenético también ha revelado las agrupaciones de los subgenotipos dentro de las especies VDVb-1 y VDVb-2, identificándose 12 subgenotipos en los VDVb-1 (VDVb-1a, VDVb-1b, VDVb-1c, VDVb-1d, VDVb-1e, VDVb-1f, VDVb-1g, VDVb-1h, VDVb-1i, VDVb-1j, VDVb-1k, VDVb-1l) y 2 en VDVb-2 (VDVb-2a, VDVb-2b) (Vilcek *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2002; Vilcek *et al.*, 2004). Además, se han identificado subgenotipos adicionales del VDVb en aislados procedentes de ganado de Sudáfrica y Suiza, pero aún no han sido denominados (Kabongo *et al.*, 2003; Kabongo y Van Vuuren, 2004; Bachofen *et al.*, 2008).

### **Variabilidad antigénica**

La variabilidad antigénica del VDVb es un reflejo de la diversidad en la secuencia de regiones genómicas que codifican para las glicoproteínas de envoltura E1, E2, y E<sup>rns</sup> (Collett, 1996; Potgeiter, 1995). Estas tres glicoproteínas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, siendo la proteína E2 la inmunodominante (Donis y Dubovi, 1987; Donis *et al.*, 1988; Bolin y Ridpath, 1990) y la menos conservada (Becher *et al.*, 2003; Ridpath, 2005a). Las otras regiones genómicas que se traducen en proteínas están sujetas a variaciones menores e inducen la producción de anticuerpos no neutralizantes (Bolin y Ridpath, 1990; Boulanger *et al.*, 1991).

Los epítomos de la glicoproteína E2 que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes se ubican en la región hipervariable de la porción N-terminal de la proteína (Paton *et al.*, 1992; Deregt *et al.*, 1998a). El número preciso de epítomos es desconocido, pero diferentes estudios indican valores sobre tres hasta nueve (Xue *et al.*, 1990; Paton *et al.*, 1992; Deregt *et al.*, 1998a, 1998b), sin embargo, al parecer no todos contribuyen a la neutralización viral (Xue *et al.*, 1990). Se ha descrito un epítomo inmunodominante de la proteína E2 para VDVb-1 y tres para el VDVb-2 (Chase *et al.*, 2004).

Las pruebas de neutralización cruzada han demostrado tanto similitudes como diferencias entre las distintas especies de pestivirus (Becher *et al.*, 2003; Kabongo *et al.*, 2003; Bachofen *et al.*, 2008) y entre genotipos y subgenotipos del VDVB, lo que resulta muy importante de considerar en la aplicación de vacunas y en los resultados de pruebas serológicas, donde se emplea un genotipo y subgenotipo en particular del VDVB (Fulton *et al.*, 2003a, b; Deregt, 2005; Ridpath, 2005b). Aunque el VDVB-1 y el VDVB-2 (y sus distintos subgenotipos) presentan neutralización cruzada, pueden ser diferenciados en base a sus diferencias antigénicas (Ridpath, 2010). Se ha determinado que los títulos de anticuerpos neutralizantes contra miembros de grupos de pestivirus heterólogos son significativamente más bajos que aquellos contra grupos homólogos (Becher *et al.*, 2003; Fulton *et al.*, 2003b; Fulton, 2005; Ridpath, 2005b; Bachofen *et al.*, 2008). Además, los patrones de unión de los anticuerpos monoclonales son distintos (Ridpath *et al.*, 1994; Bolin y Ridpath, 1998).

### **Variabilidad biológica**

La citopatogenicidad es uno de los caracteres biológicos más importantes para el VDVB; el término citopático (o citopatogénico) se refiere a la capacidad que tiene un aislado viral de producir un daño celular visible *in vitro* (Radostits y Littlejohns, 1988). El VDVB puede manifestarse como citopático (CP) o no citopático (NCP) (Baker, 1995). El biotipo CP induce vacuolización citoplasmática y cambios celulares que resultan en muerte celular dentro de 2 a 3 días después de la inoculación del virus en el cultivo celular (Lee y Gillespie, 1957; Gillespie *et al.*, 1960).

Asociado a la citopatogenicidad de los aislados está el hecho de que una cepa NCP (>95% de las infecciones) genera una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes e infecta una mayor variedad de tejidos (tracto digestivo y respiratorio, tejido linfoide, órganos de la reproducción, y tejidos embrionarios y fetales) (Spagnuolo-Weaver *et al.*, 1997; Lambot *et al.*, 1998) que su cepa CP homóloga, en que la respuesta inmune tiende a ser más celular (Lambot *et al.*, 1997) e infectar principalmente el epitelio y tejido linfático del aparato digestivo (Lambot *et al.*, 1998).

En el biotipo NCP la proteína NS2-3 siempre se encuentra como una molécula única, en cambio en los virus CP se encuentra parcialmente procesada generando NS2 y NS3, encontrándose en el citoplasma NS2-3, NS2 y NS3 (Meyers *et al.*, 1996).

Se cree que las cepas CP del VDVB se originarían a partir de cepas NCP del virus a través de eventos mutacionales que resultan en la escisión de la proteína viral NS2-3 en las proteínas NS2 y NS3. Dentro de los eventos mutacionales capaces de originar cepas CP del virus se describe la presencia de inserciones de secuencias celulares, duplicación de secuencias virales con o sin inserciones, deleciones, y mutaciones puntuales en el genoma viral (Greiser-Wilke *et al.*, 1993, Tautz *et al.*, 1994; Kummerer *et al.*, 1998; Quadros *et al.*, 2006). De éstos, el evento mutacional observado más frecuentemente es la recombinación, en la cual pequeños trozos del genoma (provenientes de otro VDVB o de una célula hospedera infectada) son insertados en el genoma de una cepa NCP del VDVB (Becker, 2000). No todas las recombinaciones genéticas ocasionan cambios en el biotipo, algunos virus NCP presentan inserciones (Greiser-Wilke *et al.*, 1993; Meyers *et al.*, 1996; Ridpath *et al.*, 2006) y algunos virus CP no las presentan (Quadros *et al.*, 2006).

### **Hospederos y reservorios**

Los pestivirus afectan naturalmente a los ungulados domésticos del orden Artiodactyla (rumiantes y porcinos), los que pueden desarrollar la enfermedad o servir de reservorios (Murphy *et al.*, 1999). No son estrictamente especie-específicos, pudiendo atravesar la barrera inter-especie e infectar no sólo a animales domésticos (bovinos, ovinos, porcinos) sino que también a animales de vida libre (Vilcek *et al.*, 2005; Evermann, 2006).

Tradicionalmente, los pestivirus son nombrados según el hospedero del que son aislados y las enfermedades que ocasionan. Bajo condiciones naturales las infecciones con VFPC han sido encontradas exclusivamente en cerdos (Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Becher *et al.*, 2003), mientras que, en contraste, el rango de hospederos del VDVB y el VEF no se restringe a bovinos y ovejas sino que incluye un amplio rango de hospederos dentro de los artiodáctilos (Plowright, 1969; Hamblin y Hedger, 1979; Doyle y Heuschele, 1983; Nettleton, 1990; Becher *et al.*, 1997, 1999).

Ha sido posible identificar pestivirus aislados desde los siguientes animales silvestres: jabalí (Stadejek *et al.*, 1997); búfalo (Becher *et al.*, 1997); jirafa (Becher *et al.*, 1997); bongo, ciervo, corzo y bisonte europeo (Becher *et al.*, 1999); eland común (Vilcek *et al.*, 2000); reno (Avalos-Ramirez *et al.*, 2001); ciervo ratón (Grondahl *et al.*, 2003); rebeco (Arnal *et al.*, 2004); bisonte canadiense (Deregt *et al.*, 2005); pudú (Pizarro-Lucero *et al.*, 2005); y antílope americana (Vilcek *et al.*, 2005). De los pestivirus identificados hasta ahora, tres especies (VFPC, VDVB-1, "giraffe") y tres genotipos (VEF-2, VEF-4, pronghorn) parecen estar circulando en las poblaciones de animales silvestres, siendo el VDVB-1 el pestivirus mayoritariamente aislado (Vilcek y Nettleton, 2006).

Son infrecuentes los reportes de enfermedad asociada a una infección natural con el VDVB en otras especies aparte de los bovinos (Ames, 2005); sin embargo, ha sido posible aislar el virus desde animales silvestres que han mostrado signos atribuibles a la enfermedad (Ludwig y McClurkin, 1981; Van Campen *et al.*, 2001). Adquiere particular importancia el hecho de que los animales silvestres pueden participar como reservorios de la enfermedad y ser una fuente de transmisión del virus para el ganado doméstico. Por ello, la susceptibilidad de hospederos inesperados de pestivirus debe ser considerada en los programas de erradicación del VDVB (Uttenthal *et al.*, 2005).

Los pestivirus pueden ser propagados en cultivos de células primarias o permanentes de sus respectivas especies hospederas y adicionalmente adaptarse a una variedad de tipos celulares heterólogos. En comparación con la infección en especies animales, el rango de hospederos *in vitro* es en realidad mucho más amplio (Thiel *et al.*, 1996). Dentro de las líneas celulares capaces de soportar el crecimiento *in vitro* del VDVB se encuentran las células de bovino, oveja, cabra, venado, bisonte, conejo, gato doméstico y cerdo (Lee y Gillespie, 1957; Bolin *et al.*, 1994; Ames, 2005). Sin embargo, aparentemente los cultivos celulares de humano y roedores no soportan la replicación de pestivirus (Thiel *et al.*, 1996).

## **Infección en bovinos**

La infección ocurre a través de la inhalación o ingestión de productos contaminados con saliva, secreciones óculo-nasales y uterinas, leche, semen, heces, orina y sangre procedentes de animales infectados con el VDVB (Radostits y Littlejohns, 1988). La replicación inicial del virus ocurre en la mucosa alrededor del sitio de entrada y es responsable de la ulceración de la mucosa y la subsecuente salivación y descarga nasal (Baker, 1987). Desde aquí el virus entra a las células objetivo en el tejido linfoide que reviste a la orofarínge, especialmente las células epiteliales de las criptas tonsilares, donde el antígeno viral es rápidamente encontrado durante la infección aguda, siendo detectable en la sangre periférica dos a cuatro días después de ocurrida la infección oral o nasal (Mills y Luginbuhl, 1968) y eliminado de forma transitoria por un periodo de 4-15 días (Thurmond, 2005). El virus es capaz de multiplicarse en todas las poblaciones de linfocitos así como también en células accesorias (Bielefeldt-Ohmann, 1983; Howard, 1990), provocando la reducción de los linfocitos circulantes y supresión de las funciones inmunes innatas (Bolin *et al.*, 1985b; Chase *et al.*, 2004). Se produce una disminución en el número de linfocitos T cooperadores o "helper" (CD4+), linfocitos T citotóxicos/supresores (CD8+), linfocitos B y neutrófilos; en cambio, el número de células asesinas naturales (NK, del inglés "Natural Killers") y monocitos no se ve afectado (Ellis *et al.*, 1988). La inmunosupresión generará una resistencia reducida a patógenos secundarios aumentando la severidad de la enfermedad clínica después de infecciones secundarias (Bolin, 2002). La descripción de una condición hemorrágica de la enfermedad involucra a las plaquetas o sus precursores celulares en la patogénesis de la infección del VDVB. El mecanismo responsable de la deficiencia plaquetaria no está bien dilucidado, pudiendo ser inmunomediada o por interacción directa con la célula (Corapi *et al.*, 1989; Walz *et al.*, 1999; Evermann y Barrington, 2005).

La presentación clínica de la diarrea viral bovina (DVB) varía dependiendo de la cepa viral, la especie animal, el estado inmune, el estado reproductivo y la edad del hospedero; además, se pueden presentar infecciones concomitantes con otros patógenos agravando el cuadro. Aunque el término "diarrea" es prominente en el nombre de la enfermedad, son más frecuentes las

enfermedades respiratorias y reproductivas asociadas al virus (Evermann y Barrington, 2005; Ridpath *et al.*, 2006).

La forma clínica que más se presenta en el ganado se manifiesta como una enfermedad leve de alta morbilidad y baja letalidad, caracterizada por depresión, fiebre, leucopenia transitoria, diarrea leve y una recuperación rápida en pocos días con la producción de anticuerpos neutralizantes (Olafson *et al.*, 1946; Brownlie, 1985; Duffell y Harkness, 1985), hecho que explicaría las altas prevalencias serológicas en los rebaños (Radostits y Littlejohns, 1988). En el ganado lechero esta presentación clínica puede ir acompañada de una considerable disminución en la producción láctea (Duffell y Harkness, 1985).

En 1987 se reportó la aparición de casos de trombocitopenia con hemorragia asociados a infección con VDVB en bovinos de leche del noreste de Estados Unidos, cuyas cuentas plaquetarias fueron de 2.000 a 33.000 plaquetas por  $\mu\text{l}$ , siendo los valores normales de 100.000 a 800.000 plaquetas por  $\mu\text{l}$  (Perdrizet *et al.*, 1987; Rebhun *et al.*, 1989). Los signos clínicos incluían petequias y equimosis en las superficies mucosas, epistaxis, diarrea sanguinolenta, sangramiento en los sitios de inyección o trauma, fiebre, leucopenia y muerte (Corapi *et al.*, 1990; Perdrizet *et al.*, 1987); y en algunos casos también se acompañaban de neumonía y pleuresía fibrinosa localizada (Rebhun *et al.*, 1989; Corapi *et al.*, 1990; Bolin y Ridpath, 1992; Broes *et al.*, 1992). Corapi *et al.*, (1989) reprodujeron experimentalmente esta condición, la que posteriormente fue denominada como "síndrome hemorrágico" (Ridpath *et al.*, 1994). La expresión de los signos clínicos variaba entre animales y sólo una minoría desarrollaba un síndrome hemorrágico fulminante, mientras que otros sufrían una marcada linfopenia y trombocitopenia y sucumbían sin una evidente manifestación clínica de hemorragia (Evermann y Barrington, 2005). Los mecanismos pato-fisiológicos de la trombocitopenia y del síndrome hemorrágico no están completamente esclarecidos, aunque se ha demostrado que el antígeno viral se encuentra asociado a plaquetas y megacariocitos, y en adición a la trombocitopenia la función plaquetaria se encuentra alterada (Walz *et al.*, 1999).

En los inicios de la década del noventa se presentó en el ganado bovino de Estados Unidos y Canadá otra presentación clínica de la enfermedad, diferente a la forma clásica y al síndrome

hemorrágico, que fue denominada como "DVB aguda severa" (Corapi *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1994; Drake *et al.*, 1996; Sockett *et al.*, 1996; Carman *et al.*, 1998). Se presentaba con fiebre, neumonía, abortos y muerte repentina en todos los grupos de edad hasta en un 25% del rebaño (Pellerin *et al.*, 1994; Carman *et al.*, 1998). Pellerin *et al.*, (1994) y Ridpath *et al.*, (1994), determinaron que los aislados de VDVB causantes del síndrome hemorrágico y la DVB aguda severa formaban un nuevo grupo genético (genotipo) del VDVB, el que fue denominado VDVB genotipo 2 (VDVB-2).

La transmisión del VDVB puede ocurrir verticalmente mediante la infección congénita del feto. El resultado de la infección fetal dependerá de varios factores como el estado de la gestación en el que ocurrió dicha infección, la inmunocompetencia del feto en desarrollo, el biotipo del virus involucrado y la virulencia del virus (Kendrick, 1971; Roeder *et al.*, 1986; Brock *et al.*, 2005).

La infección antes de la implantación (30-45 días) reduce la tasa de concepción (Virakul *et al.*, 1988; Houe *et al.*, 1993; McGowan y Kirkland, 1995) y la vitalidad del "conceptus" provocando muerte embrionaria (Brock *et al.*, 2005). Después de producida la implantación, la infección fetal durante los 30 y 125 días de gestación ocurre por transmisión transplacentaria. Aunque los mecanismos de la infección fetal no han sido totalmente dilucidados, la evidencia sugiere que el VDVB puede atravesar la placenta al ocasionar vasculitis en el lado materno de ésta y así acceder a la circulación fetal (Fredriksen *et al.*, 1999). La transmisión del VDVB al feto durante este período de la gestación puede provocar abortos, reabsorción o muerte perinatal. Los animales que sobreviven a la infección con una cepa NCP pueden desarrollar inmunotolerancia más tarde en el desarrollo y subsecuentemente nacer como terneros persistentemente infectados (PI) (Brock *et al.*, 2005). Los terneros PI pueden sobrevivir, parecer normales o desmejorados, padecer enfermedades respiratorias y digestivas, o desarrollar la enfermedad de las mucosas (EM) que generalmente es mortal (Done *et al.*, 1980; Roeder *et al.*, 1986; Radostits y Littlejohns, 1988). Estos animales no presentan anticuerpos para el virus que les provocó esta condición y son la principal fuente de diseminación del virus debido a que eliminan varios billones de partículas virales diariamente (Carr y Carman, 2005). Los animales PI pueden permanecer clínicamente normales

durante años y reproducirse exitosamente, pero su progenie invariablemente será también de animales PI (Binkhorst *et al.*, 1983; Radostits y Littlejohns, 1988).

Una infección más tardía, entre los 125-175 días de gestación, durante el desarrollo fetal y la organogénesis puede resultar en numerosos tipos de anomalías congénitas, siendo las más frecuentes aquellas que involucran al sistema nervioso central como hipoplasia cerebelar (Kahrs *et al.*, 1970; Scott *et al.*, 1973), microencefalia, hidrocefalo, hidranencefalia (Badman *et al.*, 1981), porencefalia (Hewicker-Trautwein y Trautwein, 1994) e hipomielización (Binkhorst *et al.*, 1983). Otros defectos congénitos que se describen incluyen a la osteocondrosis (Espinasse *et al.*, 1986), neuritis óptica (Bielefeldt-Ohmann, 1984), degeneración de la retina (Scott *et al.*, 1973), hipoplasia del timo (Done *et al.*, 1980), hipotricosis/alopecia (Kendrick, 1971; Baker, 1987), pelaje rizado (Larsson *et al.*, 1991), osteogénesis imperfecta (Constable *et al.*, 1993), microoftalmia (Kahrs *et al.*, 1970; Scott *et al.*, 1973; Brown *et al.*, 1975), cataratas (Bielefeldt-Ohmann, 1984; Wohrmann *et al.*, 1992), braquignatismo (Scott *et al.*, 1972) y retardo en el crecimiento (Done *et al.*, 1980; Baker, 1987; Constable *et al.*, 1993). Además, se observan signos clínicos tales como ataxia, temores, incoordinación de movimientos, inhabilidad para mamar y ceguera (Baker, 1987).

Los fetos infectados durante el último periodo de la gestación (175 días a término) generalmente son capaces de montar una adecuada respuesta inmune y eliminar el virus (Brock *et al.*, 2005), esto gracias a que el feto gana inmunocompetencia al VDVB alrededor de los 180 días de gestación (Brown *et al.*, 1979). Los terneros se encuentran usualmente normales al nacimiento y presentan anticuerpos neutralizantes anti-VDVB previos a la ingesta de calostro (Casaro *et al.*, 1971; Kendrick, 1971; Braun *et al.*, 1973; Orban *et al.*, 1983). Sin embargo, los terneros congénitamente infectados con el VDVB podrían tener un mayor riesgo de presentar un evento de salud postnatal serio. Se ha demostrado que las infecciones congénitas durante el último trimestre de gestación pueden afectar negativamente la "performance" neonatal y la supervivencia (Muñoz-Zanzi *et al.*, 2003).

La transmisión del VDVB también se puede producir en forma horizontal debido a la administración parenteral de productos biológicos infectados, picaduras de insectos y empleo de

agujas hipodérmicas contaminadas, así como también por la inseminación e implantación de embriones procedentes de animales infectados (Radostits y Littlejohns, 1988).

Cuando los animales que mantienen una infección persistente con una cepa de biotipo NCP (infectados intrauterinamente antes de los 125 días de gestación) se sobreinfectan con una cepa CP del mismo virus desarrollan la enfermedad de las mucosas (EM) (Brownlie *et al.*, 1984; Bolin *et al.*, 1985b); por ello, en esta presentación pueden ser aislados ambos biotipos del VDVB (McClurkin *et al.*, 1985). Este "par" de virus CP y NCP están antigénicamente muy relacionados, a diferencia de lo que ocurre entre los aislados de campo del virus que presentan una gran diversidad antigénica. Esta observación avalaría la hipótesis de que durante la patogénesis de la EM el virus CP se produciría a partir del NCP a través de algún tipo de mutación (Lindenbach *et al.*, 2007).

La EM es de presentación esporádica, ocurre generalmente entre los 6 y 24 meses de edad y es invariablemente mortal (Brownlie, 1985; Baker, 1987). Los signos clínicos incluyen: anorexia, depresión, pirexia (40-41<sup>o</sup> C), letargia, diarrea profusa (acuosa, mucosa o sanguinolenta), hipersalivación, descarga nasal mucopurulenta, deshidratación, taquicardia y taquipnea. La muerte puede presentarse de forma tan súbita que puede ser el primer signo clínico observado, sin embargo generalmente ocurre 1 a 3 semanas luego de la aparición de los signos clínicos (Brownlie, 1985; Duffell y Harkness, 1985). También es posible observar edema corneal, lagrimeo y cojeras causadas por laminitis, coronitis o lesiones erosivas del espacio interdigital que comúnmente involucran a las cuatro extremidades (Radostits y Littlejohns, 1988). La lesión más prominente es la ulceración extensiva del tracto alimentario (Brownlie, 1985; Duffell y Harkness, 1985; Baker, 1987; Radostits y Littlejohns, 1988). Patológicamente, las lesiones básicas corresponden a múltiples erosiones y lesiones inflamatorias del tracto gastrointestinal con depleción del tejido linfóide de las placas de Peyer. La extensión, naturaleza y distribución de las erosiones varían de caso a caso y se ven modificadas por la acción de patógenos secundarios (Duffell y Harkness, 1985). Algunos animales sufren la enfermedad por un período prolongado, una condición que se denomina "EM crónica" (Thiel *et al.*, 1996). Estos animales presentan diarrea intermitente, anorexia, emaciación progresiva, deformaciones del casco y erosiones crónicas en la cavidad oral y piel; algunos

animales sobreviven por algunas semanas o meses, tiempo en el cual se presentan desmejorados y finalmente mueren por inanición crónica (Radostits y Littlejohns, 1988). Esta presentación crónica de la EM se desarrolla cuando un animal virémico es superinfectado con un VDVB CP que comparte una homología antigénica sólo parcial con la cepa "endógena" NCP del VDVB, esta homología parcial le permitiría al virus superinfectante tomar ventaja de la inmunotolerancia del hospedero y sobrevivir por periodos prolongados, tiempo en el cual desarrolla su potencial patógeno (Brownlie, 1991; Moennig *et al.*, 1993).

### **Infección en camélidos sudamericanos (CSA)**

Hasta hace un tiempo se consideraba que los CSA eran resistentes a desarrollar una enfermedad a causa de la infección con pestivirus, esto debido a la baja seroprevalencia e infrecuente aislamiento del virus en estos animales, lo que podría deberse al escaso contacto que tienen con animales infectados, a una resistencia a la infección o a una ineficiente transmisión del virus (Mattson, 1994). Este razonamiento también quedaba avalado por los resultados obtenidos en un estudio realizado por Wentz *et al.*, (2003), quienes infectaron experimentalmente con el VDVB a llamas preñadas las que no generaron crías PI. No obstante, Belknap *et al.*, (2000) señalan que la participación del virus debiese ser considerada en casos de abortos, diarrea, atraso en el desarrollo, pérdida de peso, y como una posible causa de muerte en camélidos jóvenes y adultos. Asimismo, Evermann (2006) observó que CSA infectados con VDVB sufren desde enfermedad respiratoria y digestiva hasta desgaste crónico e infecciones uterinas con aborto y producción de crías PI.

Los datos de la infección de CSA con pestivirus son de magnitud variable. La mayoría de las pesquisas serológicas realizadas en diferentes áreas geográficas de América del Norte y Europa señalan valores que fluctúan desde 0% a 13% de seropositividad (Haines *et al.*, 1992; Picton, 1993; Mattson, 1994; Wentz *et al.*, 2003; Danuser *et al.*, 2009; Topliff *et al.*, 2009), pero también se han detectado valores de un 22% en un rebaño de llamas de Canadá (Schwantje y Stephen, 2003) y de un 25% en rebaños de alpacas de Estados Unidos (Topliff *et al.*, 2009); además, Evermann (2006) sostiene que existen rebaños con seropositividad de hasta un 53%. En

Sudamérica, en Perú, Rivera *et al.*, (1987) informan de una seroprevalencia de un 11% en alpacas que pastaban en conjunto con ovinos y bovinos; situación similar a la observada posteriormente en el año 2002 en ese mismo país, cuando Alvarez *et al.*, (2002) reportan un 11,5% de seropositividad del VDVB en alpacas que se encontraban bajo un sistema de crianza mixto en contacto con ganado ovino y bovino. En Argentina, en un rebaño de 390 llamas que cohabitaban con ovinos y bovinos se determinó una seropositividad 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 en contacto con ganado doméstico (Celedón *et al.*, 2001). Sin embargo, no se pesquisaron animales con anticuerpos para el VDVB en 48 guanacos procedentes de la Región de Coquimbo y de la Región de Magallanes y de la Antártica Chilena, ni en 34 vicuñas, 136 alpacas y 30 llamas de la Región de Arica y Parinacota (Celedón *et al.*, 2001; Fuentes, 2007).

El primer aislamiento del VDVB desde CSA se reporta en el año 2000 en Estados Unidos y fue obtenido de muestras de tejido de una llama que sufrió una muerte repentina y que al examen histológico evidenció depleción linfocítica y atrofia del timo (Belknap *et al.*, 2000). Posteriormente, en el mismo país en el año 2002 se obtiene el VDVB desde una cría mortinada de un rebaño de alpacas (Goyal *et al.*, 2002).

En Chile, en el año 2001, de un rebaño de 200 alpacas y llamas de la Región Metropolitana con un historial de abortos y muerte posterior a la presentación de signos respiratorios y/o digestivos (Miranda, 2000) se pudo aislar e identificar el VDVB, a la vez que se detectaron varias alpacas PI en el rebaño (Arce, 2001). Posteriormente, en el año 2006 se obtuvieron aislados virales de 10 alpacas y 8 llamas pertenecientes a 4 rebaños de la Región Metropolitana en los que se sospechaba la presencia de la enfermedad, y los virus aislados fueron identificados como VDVB-1 (6 alpacas) y VDVB- 2 (4 alpacas y 8 llamas) (Celedón *et al.*, 2006).

Foster *et al.*, (2007) realizan el aislamiento del VDVB desde tres alpacas del Reino Unido que presentaban un historial de debilidad crónica y diarrea. Por otra parte, durante un período comprendido entre los años 2004 y 2007 se llevó a cabo un muestreo en una población de más de

12.000 alpacas en Estados Unidos y Canadá, logrando obtener un total de 46 aislados de VDVB (Kim *et al.*, 2009).

En Canadá, Carman *et al.*, (2005) realizan el aislamiento del virus desde dos crías de alpaca, una que fue abortada y otra que resultó ser PI y que presentó bajo peso al nacimiento, anorexia, letargia leve, diarrea crónica, episodios de lagrimeo, una prominente hernia umbilical, y la fibra quebradiza y menos densa que lo normal para su edad con una mayor cantidad de fibras tipo pelo de folículos primarios. Al examen microscópico, se observó necrosis ocasional de células ganglionares de la retina y en algunas zonas del cerebro fue posible distinguir focos que contenían cúmulos de detritus celular que podrían ser indicativos de lisis de neuronas o microglia; además, se pudo identificar por inmunohistoquímica la presencia del antígeno del VDVB en estómago, riñones, glándula tiroides, epitelio bucal y piel.

Varios autores coinciden en señalar que la forma crónica de la enfermedad es la más frecuente, con signos clínicos como desmedro crónico, baja ganancia de peso, diarrea crónica, inflamación en articulaciones, episodios de descarga nasal y neumonía sin respuesta al tratamiento con antibióticos (Goyal *et al.*, 2002; Wentz *et al.*, 2003; Carman *et al.*, 2005; Mattson *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2007; Van Amstel y Kennedy, 2010). Los signos pueden presentarse a los pocos meses de vida y generalmente resultan en eutanasia o la muerte del animal a una edad temprana (Van Amstel y Kennedy, 2010). Los hallazgos macroscópicos observados post-mortem corresponden a emaciación, córneas opacas, congestión y edema pulmonar, neumonía, linfadenopatía mesentérica, líquido en cavidades corporales, contenido intestinal acuoso y líneas de fibrina en el saco pericárdico (Belknap *et al.*, 2000; Mattson *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2007).

Con todos estos antecedentes sobre la infección del VDVB en camélidos sudamericanos, fundamentalmente llamas y alpacas, queda demostrado que son especies susceptibles de infectarse con pestivirus y sufrir enfermedades importantes; siendo la mayor posibilidad de contagio el contacto con ganado bovino y ovino infectado (Evermann, 2006).

El análisis genómico de diferentes aislados de VDVB obtenidos de alpacas y llamas, ubicados mayoritariamente en Estados Unidos, ha permitido establecer que el VDVB-1 NCP es el

principal implicado en las infecciones de estas especies (Van Amstel y Kennedy, 2010). En cuanto a los subgrupos involucrados, se describen infecciones con VDVB-1a (Wentz *et al.*, 2003), VDVB-1b (Goyal *et al.*, 2002; Wentz *et al.*, 2003; Carman *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009) y VDVB-2a (Wentz *et al.*, 2003). En Sudamérica y particularmente en Chile, mediante el análisis de la región codificante del gen de la proteína E2 del VDVB de 24 aislados provenientes de alpacas y llamas ubicadas en diferentes rebaños de la Región Metropolitana, fue posible identificar 5 aislados de alpacas como VDVB-1b, 5 de alpacas y 11 de llamas como VDVB-1e, y 1 aislado de alpaca y 2 de llamas como VDVB-2a (Beamín, 2009).

### **Control de la enfermedad**

En razón a las altas pérdidas económicas que ocasiona el VDVB en bovinos, países escandinavos como Suecia, Dinamarca y Noruega han controlado y erradicado el VDVB del ganado de sus territorios (Stahl *et al.*, 2005; Uttenthal *et al.*, 2005; Valle *et al.*, 2005), lo que ha incentivado a otros países de Europa a desarrollar programas de control de la enfermedad (Greiser-Wilke *et al.*, 2003; Sandvik, 2004; Houe *et al.*, 2006). Sin embargo, el esquema empleado con éxito en los programas de control de países escandinavos sólo sería aplicable a aquellas regiones que poseen una baja densidad del ganado y donde la vacunación no está permitida (Goyal, 2005; Houe *et al.*, 2006). Por lo tanto, los programas de control del VDVB deberían adaptarse a la situación propia de cada país o región y, en general, cumplir con las siguientes consideraciones: proveer bioseguridad apuntando al desarrollo de prácticas de manejo que prevengan la introducción del VDVB al rebaño (controlar el movimiento de animales y el contacto con posibles reservorios del virus tanto domésticos como silvestres), vigilancia (para detectar y remover animales PI) y vacunación (en los países que está permitida) (Fulton, 2005; Ridpath, 2010).

Los programas de vacunación tienen como objetivos evitar o disminuir la presentación de la enfermedad y prevenir la infección del feto a través de la vacunación de las hembras antes de la preñez, siendo éste último el objetivo más importante ya que la infección del feto puede ocasionar pérdidas embrionarias, abortos, malformaciones congénitas o la producción de animales PI,

principales diseminadores del virus en el rebaño (Fulton, 2005; Ridpath, 2010). A pesar de existir un gran número de vacunas disponibles en el mercado, ya sean simples o combinadas, modificadas o inactivadas, la mayoría contienen solo un subgrupo de cada genotipo del VDVB. Las vacunas más comúnmente empleadas contienen sólo un subgrupo del genotipo 1 del VDVB, el subgrupo 1a (Vacunas: BoviShield 4, Pyramid 4, Reliant 4, Jencine 4, Herd Vac 3, Elite 4, Respishield 4, CattleMaster 4). Otras, además de contar con una cepa del VDVB-1a incorporan una del genotipo 2 subgrupo a (VDVB-2a) (Vacunas: Express 5, Frontier 4 Plus, Titanium 5, Horizon 4 Plus, Master Guard 5, Triangle 4 + type II, ViralShield 5, Vista 3 SQ). Sólo una vacuna además de contener VDVB-1a también incorpora VDVB-1b (Vacuna Surround 4) (Fulton *et al.*, 2003a; Fulton, 2005). Al respecto, la información existente da cuenta de que la distribución genómica expresada en genotipos y subgrupos, y variantes dentro de un subgrupo, se correlaciona con diferencias antigénicas, significando esto que las vacunas protegerían en menor grado ante infecciones con VDVB de subgrupos y variantes diferentes a los aportados por la vacuna (Fulton *et al.*, 2003a; Fulton, 2005). Sin embargo, se tienen resultados de experiencias que resultan contradictorios, así por ejemplo, ha sido posible aislar VDVB-1a, VDVB-1b y VDVB-2 desde animales que fueron vacunados con cepas de VDVB-1a semanas o meses antes de la obtención de los aislados virales (Van Campen *et al.*, 2000; Fulton *et al.*, 2003a; Fulton, 2005). Por otra parte, en forma experimental en Estados Unidos se aplicó a un grupo de alpacas una vacuna modificada comercial de uso en bovinos que contiene VDVB-1a (cepa Singer) y VDVB-2a (cepa 125C), lográndose seroconversión y resistencia al desafío con un aislado de VDVB-1b obtenido de alpacas (Byers *et al.*, 2010).

En Chile se encuentra autorizada la aplicación de vacunas contra el VDVB, las que son utilizadas por los productores principalmente para controlar las pérdidas reproductivas en el ganado bovino. Están disponibles en el mercado cinco vacunas contra el VDVB autorizadas por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), todas multivalentes y con VDVB inactivado, y son las siguientes: las vacunas "CattleMaster 4" (Pfizer®) y "CattleMaster 4 + L5" (Pfizer®) que contienen una cepa CP (5960) y una NCP (6309) del VDVB-1a, la vacuna "CattleMaster GOLD FP5" (Pfizer®) que también

presenta la cepa CP 5960 del VDVB-1a además de una NCP (53637) del VDVB-2, y las vacunas "Triangle 4 + BVD tipo II" (Bayer®) y "Triangle 9 + BVD tipo II" (Bayer®) que están elaboradas con 2 cepas CP, una del VDVB-1a (Singer) y otra del VDVB-2a (5912) (SAG, 2011).

Ante el conocimiento de que en Chile están presentes los genotipos VDVB-1a en bovinos y VDVB-1b, VDVB-1e y VDVB-2a tanto en bovinos como en CSA (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006; Beamín, 2009; Donoso, 2009); y en la eventualidad que se pretenda desarrollar y aplicar vacunas para el control de las pérdidas ocasionadas por el VDVB en los CSA, surge la necesidad de conocer si aislados del VDVB obtenidos de camélidos comparten similitud antigénica entre ellos, con aislados de bovinos y con cepas de referencia empleadas en la elaboración de vacunas. Al respecto, se describe que los ensayos serológicos, en particular las pruebas de seroneutralización cruzada, han sido ampliamente utilizados para demostrar la presencia de similitudes o diferencias antigénicas entre diferentes especies y genotipos de pestivirus (Howard *et al.*, 1987; Pellerin *et al.*, 1994; Dekker *et al.*, 1995; Paton *et al.*, 1995; Botton *et al.*, 1998; Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Bachofen *et al.*, 2008; Behera *et al.*, 2011). El coeficiente de similitud antigénica (R) resulta ser de especial utilidad en la caracterización de relaciones antigénicas debido a que permite determinar si existen diferencias antigénicas significativas entre un par de virus, las que se encuentran indicadas por valores de  $R \leq 25$  que representan diferencias en más de cuatro diluciones entre las reacciones recíprocas de los virus con sus antisueros homólogos y heterólogos (Archetti y Horsfall, 1950).

### **III.- HIPÓTESIS**

Aislados nacionales del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) obtenidos a partir de camélidos sudamericanos domésticos (alpacas y llamas) presentan diferencias antigénicas significativas entre sí, y con VDVB obtenidos de bovinos y cepas de referencia del VDVB frecuentemente empleadas en la elaboración de vacunas y en pruebas diagnósticas.

### **IV.- OBJETIVO GENERAL**

Comparar antigénicamente aislados del VDVB obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos (CSD) con aislados de VDVB obtenidos de bovinos y con cepas de referencia del VDVB.

### **V.- OBJETIVO ESPECÍFICO**

Determinar mediante pruebas de seroneutralización cruzada si existen diferencias antigénicas significativas entre diferentes genotipos y subgrupos del VDVB aislados de CSD, con relación a los diferentes subgrupos de aislados nacionales de bovinos y a un subgrupo de las cepas virales corrientemente empleadas en la fabricación de vacunas comerciales.

## **VI.- MATERIAL Y MÉTODOS**

El presente trabajo fue parte del proyecto FONDECYT N°1080130 "Análisis genómico, antigénico y de virulencia de pestivirus obtenidos de rumiantes domésticos". El estudio se realizó en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **Muestras**

Para la ejecución de esta memoria se emplearon aislados virales de campo del VDVB que provenían de muestras recolectadas de CSD y bovinos de la Zona Central de Chile entre los años 1993 y 2007, e involucraban a animales procedentes de rebaños sanos y de rebaños con antecedentes de signos clínicos atribuibles a la enfermedad (abortos, nacimiento de crías muertas, y muerte en adultos). Los pestivirus de CSD fueron obtenidos de dos rebaños de alpacas y cuatro de llamas, ubicados en distintas localidades de la Región Metropolitana (FONDECYT 1981193), e identificados como virus de la diarrea viral bovina genotipo 1 subgrupo b (VDVB-1b) y subgrupo e (VDVB-1e), y genotipo 2 subgrupo a (VDVB-2a) (Beamín, 2009) (Cuadro N° 1). Los aislados de bovinos provenían de dos rebaños de la Región Metropolitana y uno de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins (Proyecto FONDECYT 1961183) y fueron identificados como VDVB-1b y VDVB-1e (Cuadro N° 2). Los aislados virales utilizados en este estudio se seleccionaron en base a su diversidad genética, eligiendo a aquellos que se ubicaban más distantes entre sí en el árbol filogenético (Beamín, 2009) (Anexo 1) y, como mínimo, a un aislado de cada subgrupo. Además, se incluyeron las cepas de referencia NADL (ATCC VR-1422™, American Type Culture Collection –ATCC–, Rockville, Maryland, USA), Singer (140-BDV, National Veterinary Services Laboratories –NVSL–, Ames, Iowa, USA) y Oregon (NVSL 144-BDV), que corresponden a VDVB genotipo 1 subgrupo a (VDVB-1a) y que son las cepas virales citopatogénicas empleadas en la fabricación de casi la totalidad de las vacunas disponibles en el mercado. Tanto las cepas de referencia como los

aislados de pestivirus de camélidos y bovinos se mantuvieron conservados a -80°C en el Laboratorio de Virología de la facultad.

**Cuadro N° 1.** Identificación y procedencia de aislados del virus diarrea viral bovina (VDVB) obtenidos de camélidos sudamericanos domésticos (alpacas y llamas) de la Región Metropolitana (1998-2002)

Identificación del animal	Especie	Lugar de procedencia (Localidad, Provincia)	Año del aislamiento del virus	Sexo	Edad	Genotipo del virus	Identificación del rebaño	Antecedentes clínicos del rebaño
A2	Alpaca	La Pintana, Santiago	1998	Hembra	8 años	1e	A	Sin antecedentes clínicos.
A27	Alpaca	La Pintana, Santiago	1998	Hembra	>4 años	2a		
A290	Alpaca	Colina, Chacabuco	1998	Hembra	3 años	1e	B	Antecedentes de enfermedad respiratoria y digestiva, abortos, mortinatos, y muertes de adultos en el rebaño.
A390	Alpaca	Colina, Chacabuco	1998	Hembra	>10 años	1b		
A474*	Alpaca	Colina, Chacabuco	1998	Hembra	>4 años	1b		
A502	Alpaca	Colina, Chacabuco	1998	Macho	Cría	1e		
LL626	Llama	La Pintana, Santiago	1999	---	---	2a	C	Sin antecedentes clínicos.
LL794	Llama	Maipú, Santiago	1999	Hembra	4 años	2a	D	Antecedentes de aborto en el rebaño.
LL827	Llama	Maipú, Santiago	1999	Hembra	4 años	1e		
LL1087	Llama	La Pintana, Santiago	2000	Macho	---	1e	E	Antecedentes de muerte súbita en el rebaño.
LL1723	Llama	La Pintana, Santiago	2002	Macho	adulto	1e	F	Antecedentes de partos prematuros y muerte súbita en el rebaño. **

\*Obtenido de una hembra después de 6 a 8 meses de haber abortado con una gestación de 7 meses.

\*\*Se observan animales con hemorragias intestinales en el rebaño.

**Cuadro N° 2.** Identificación y procedencia de aislados del virus diarrea viral bovina (VDVB) obtenidos de bovinos de la Región Metropolitana y de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins (1993-2007)

Identificación del animal	Especie	Lugar de procedencia (Localidad, Provincia, Región)	Año del aislamiento del virus	Sexo	Edad	Genotipo del virus	Identificación del rebaño	Antecedentes clínicos del animal
CH113	Bovino	María Pinto, Melipilla, Región Metropolitana	1995	Hembra	4 años	1b	G	Animal PI.*
CH511	Bovino	Rancagua, Cachapoal, Región del Libertador General Bernardo O'Higgins	1993	Hembra	vaquilla	1e	H	Aborto de un feto a los 8 meses.**
CH1025	Bovino	Mallarauco, Melipilla, Región Metropolitana	2007	---	---	1b	I	Sin antecedentes clínicos.

\*Vaca de un parto, sin abortos.

\*\*Antecedentes de mortinatos y abortos en el rebaño.

### **Preparación del "stock" de virus**

Para la recuperación de los virus, éstos fueron inoculados en monocapas de 25 cm cuadrados de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney, ATCC CCL 22) de 24 horas de crecimiento, cultivadas en MEM (Medio Esencial Mínimo con sales Earle, L-Glutamina y aminoácidos no esenciales Cat. N° 41500-067 (GIBCO™ Invitrogen), suplementado con buffer HEPES, 5,95 gr/l Cat. N° 11344-041 (GIBCO™ Invitrogen); estreptomycin, 100µg/ml, penicilina, 100 UI/ml (Combiótico®); anfotericina B, 2.5 µg/ml (Fungizona®); piruvato de sodio, 1mM, Cat. N° 11360-070 (GIBCO™ Invitrogen); y bicarbonato de sodio, 1,5 gr/l) suplementado con suero equino (8%) proveniente del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Se realizaron tres a cinco pasajes hasta la obtención de una cantidad de virus mayor o igual a 100.000 dosis infectante en cultivo de tejidos (DICT<sub>50</sub>) por ml. Para detectar la presencia de antígenos virales de los virus no citopáticos (NCP) se efectuó la prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IPI). Los virus recuperados fueron sembrados en

monocapas de mayor superficie a fin de obtener un "stock" viral de 60 ml, que posteriormente fue dispensado en alícuotas de 1ml y conservado a -80°C (Anexo 2).

### **Titulación del virus**

Para la titulación viral se emplearon placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Nunclon D Cat. Nº 167008, Thermo Fisher Scientific) sembradas con 10 mil células de la línea celular MDBK por pocillo, con un tiempo de crecimiento no mayor a 24 horas. Se sembraron diluciones virales en base 10 desde 1:10 a 1:1millón en MEM en un volumen de 50µl, empleando 4 pocillos por dilución. Después de incubar por 60 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, a cada pocillo se le adicionaron 50µl de medio de cultivo de mantención (MEM suplementado con un 2% de suero equino), incubándose por 72 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. En las cepas citopáticas (NADL, Singer y Oregon) la presencia del virus fue determinada mediante la observación de efecto citopático en el cultivo celular. En el caso de los aislados no citopáticos, el medio de cultivo fue retirado y las células fijadas a la microplaca con acetona al 20% en buffer fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,6, para posteriormente detectar la presencia de antígenos virales por prueba de IPI.

El título viral, expresado en DICT<sub>50</sub> por ml, correspondió a la dilución del virus que presentó antígenos virales en el 50% de los pocillos inoculados, lo que fue calculado por el método de Reed y Muench (1938).

### **Prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IPI)**

Las células, después de fijadas, se hidrataron con una solución "buffer" de lavado (0,9 ml Tween 80 25%/400 ml PBS 0,01M pH 7,6) en un volumen de 50µl por cada pocillo, luego el sobrenadante fue retirado y se añadieron 50µl de una mezcla de 4 anticuerpos monoclonales para pestivirus (WB112, WB166, WB103 y WB214) obtenidos del Central Veterinary Laboratory Agency (CVL) (Weybridge, UK) (IPEX-BVD staining kit Cat. Nº PA 0258). Después de incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente, la mezcla fue descartada y las células lavadas con PBS 0,01M pH 7,6. Posteriormente, se adicionaron 50µl de suero de cabra anti-inmunoglobulina de ratón

conjugado con peroxidasa de rábano picante (Goat anti-mouse IgG-HRP, Invitrogen Molecular Probes, Cat. N° D22185), que después de 60 minutos de incubación fue retirado y las células lavadas nuevamente. A continuación, se agregaron 50µl de un sustrato para la enzima, que consiste en diaminobencidina (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate, Cat. N° D5637-5G, Sigma-Aldrich®) en presencia de un dador de oxígeno (perborato de sodio tetrahidratado) (Sodium perborate tetrahydrate Cat. N° 71840, Fluka, Sigma-Aldrich®); cuya mezcla (Diaminobencidina 0,6 mg/ml y Perborato de sodio tetrahidratado 0,4 mg/ml en PBS 0,01M pH 7,6), al tomar contacto con la enzima, produce un precipitado coloreado insoluble que permite visualizar a las células infectadas con el antígeno viral.

### **Elaboración de sueros hiperinmunes**

Para la obtención de sueros anti VDVB de las cepas de referencia (NADL, Singer y Oregon) y aislados del VDVB obtenidos de bovinos, alpacas y llamas se emplearon conejos adultos (>2kgs) de raza Neozelandés, no consanguíneos, obtenidos del Bioterio del Instituto de Salud Pública (Ministerio de Salud), los cuales fueron mantenidos en la Unidad de Animales de Experimentación del Departamento de Medicina Preventiva Animal (Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile) y criados de acuerdo a las condiciones señaladas por Romero y Fuenzalida, (1983) (Anexo 3).

El proceso de inmunización consistió en suministrar a cada conejo un estímulo antigénico con un determinado virus de los 17 empleados en este estudio (14 aislados y 3 cepas), inoculando 2 millones de DICT<sub>50</sub> contenidas en 1 ml en la vena marginal de la oreja en los días 1, 3, 5, 7 y 9. Al día 40 se re-inocularon con 1 ml del mismo virus por la misma vía, y al cabo de 15 días se tomó una muestra de sangre (bajo sedación) y se midió el nivel de anticuerpos neutralizantes frente a 100 DICT<sub>50</sub> del virus que indujo su producción (homólogo). En caso de que el nivel de anticuerpos logrado no fuera suficiente, se repitió el proceso a los 30 días inoculando por la misma vía la misma dosis de virus. Para la obtención del suero, los animales fueron sangrados a blanco bajo anestesia y posteriormente sacrificados por sobredosis de ésta.

### **Titulación de anticuerpos neutralizantes**

Para la titulación de anticuerpos de los sueros anti VDVB se realizaron diluciones al doble en MEM del suero previamente inactivado (56° C por 30 min) y diluido (1:5), desde 1:10 a 1:640 en volumen de 50 $\mu$ l, empleando 4 pocillos por cada dilución; y se enfrentaron en igual volumen a una suspensión del virus homólogo que contiene 200 DICT<sub>50</sub>. Posterior a una incubación a 37°C por 60 minutos, la mezcla suero-virus se sembró sobre monocapas de células MDBK de 24 horas de crecimiento. Después de una segunda incubación de 60 minutos a 37°C, se le adicionaron 100 $\mu$ l de medio de cultivo de mantención. A continuación, la placa fue incubada a 37° C por 72 horas, tiempo en el cual se retiró el medio de cultivo y las células fueron fijadas con acetona al 20% en PBS 0,01M pH 7,6, para posteriormente detectar la presencia de antígenos virales mediante la prueba de IPI. En el caso de las cepas de referencia citopatogénicas (NADL, Singer y Oregon) no se retiró el medio de cultivo y la presencia del virus fue evidenciada directamente por la observación microscópica del efecto citopático.

El título neutralizante del suero, que corresponde al valor recíproco de la dilución de suero que protege al 50% de los pocillos con células expuestos a la acción de 100 DICT<sub>50</sub>, fue calculado por el método de Reed y Muench (1938) y expresado como dosis protectora 50% (DP<sub>50</sub>).

### **Determinación de diferencias antigénicas**

A fin de establecer la variabilidad antigénica existente entre los aislados de alpacas y llamas con los aislados de bovinos y las cepas de referencia (NADL, Singer y Oregon), se efectuaron pruebas de seroneutralización cruzada haciendo reaccionar 100 DICT<sub>50</sub> de cada aislado y cepa viral con su respectivo suero homólogo y con cada uno de los sueros heterólogos. La prueba de seroneutralización se realizó de igual manera a la antes descrita para la titulación de anticuerpos, pero las diluciones de suero abarcaron un rango desde 1:2 hasta 2480. Cada una de las pruebas se repitió un mínimo de 3 veces. Con los títulos DP<sub>50</sub> se obtuvo la media geométrica (MG) para cada reacción virus/suero anti homólogo y virus/suero anti heterólogo.

Para establecer si existían diferencias antigénicas significativas entre los distintos aislados virales se calculó el coeficiente de similitud antigénica (R) entre los promedios de cada par de aislados (Archetti y Horsfall, 1950), empleando la siguiente fórmula:

$$R = 100 \times \sqrt{\frac{\text{título del aislado A con antisuero B} \times \text{título del aislado B con antisuero A}}{\text{título del aislado A con antisuero A} \times \text{título del aislado B con antisuero B}}}$$

Valores de  $R \leq 25$  representan diferencias mayores de 4 veces entre los títulos con sueros homólogos y heterólogos, e indican la existencia de diferencias antigénicas significativas. Valores mayores a 25 dan cuenta de similitud antigénica (Hubalek, 1982).

## VII.- RESULTADOS

En esta memoria se buscó establecer hasta qué punto aislados de VDVB-1b, VDVB-1e y VDVB-2a obtenidos de alpacas y llamas manifiestan diferencias a nivel antigénico con cepas de referencia (VDVB-1a) y con aislados de VDVB-1b y VDVB-1e obtenidos de bovinos. Con este fin, se realizaron pruebas de seroneutralización cruzada empleando antisueros (elaborados mediante inmunizaciones de conejos) en reacciones de seroneutralización homólogas y heterólogas frente los distintos aislados y cepas del VDVB incluidos en este estudio: tres cepas de referencia del VDVB-1a (NADL, Singer, Oregon); dos aislados de bovinos (CH113 y CH1025) y dos aislados de alpacas (A390 y A474) del VDVB-1b; un aislado de bovino (CH511), tres aislados de alpacas (A2, A290 y A502) y tres aislados de llamas (LL827, LL1087 y LL1723) del VDVB-1e; y un aislado de alpaca (A27) y dos de llamas (LL626 y LL794) del VDVB-2a (Cuadro N° 1 y Cuadro N° 2).

Los sueros anti-VDVB elaborados en conejos, en reacción de neutralización con su virus homólogo dieron valores de títulos seroneutralizantes que fluctuaron de 80 DP<sub>50</sub> (aislado LL626) a 960 DP<sub>50</sub> (aislado A502). Estos valores, en la mayoría de las reacciones de suero-virus homólogos fueron más altos que las reacciones entre suero y virus heterólogos (Cuadro N° 3).

En las reacciones en que se incluyeron pares de suero-virus pertenecientes a un mismo subgrupo genómico, todos los sueros fueron capaces de neutralizar a cada uno de los virus de su subgrupo, pero los títulos DP<sub>50</sub> fueron variados. Del total de las reacciones heterólogas dentro de un mismo subgrupo (66) hubo 9 que mantuvieron los títulos de las respectivas reacciones homólogas; 35 que presentaron diferencias de menos de una dilución; 11 que se diferenciaron en 1 dilución; 7 con diferencias de 2 diluciones; 3 con diferencias de 3 diluciones, y una sola reacción en que hubo una diferencia mayor a 4 diluciones, que corresponde a la reacción del suero anti aislado A474 con un aislado heterólogo (CH1025) del mismo subgrupo (1b) y cuyo título fue 44 DP<sub>50</sub>, mientras que en la reacción homóloga el título fue 860 DP<sub>50</sub> (Cuadro N° 3 y Cuadro N° 4).

En las reacciones de neutralización que involucraron pares suero-virus pertenecientes a diferentes subgrupos genómicos, los títulos de neutralización fueron menores a los que se

presentaron en reacciones de antisueros con virus de su mismo subgrupo genómico, llegando incluso a valores menores a dos DP<sub>50</sub>, lo que significa que en estos casos no hubo neutralización del virus por parte del suero. Esta situación se presentó mayoritariamente en las reacciones que incluían sueros elaborados con virus del genotipo 1 (subgrupos 1a, 1b y 1e) enfrentados a virus del genotipo 2 (subgrupo 2a) (Cuadro N° 3).

**Cuadro N° 3.** Títulos de anticuerpos neutralizantes en reacción de seroneutralización cruzada entre cepas y aislados del virus diarrea viral bovina (VDVB)

Subgrupos Aislados Sueros anti		Genotipo 1													Genotipo 2			
		Subgrupo 1a			Subgrupo 1b				Subgrupo 1e						Subgrupo 2a			
		Cepa MADL	Cepa Singer	Cepa Oregon	CH113	CH1025	A390	A474	CH511	A2	A290	A502	LL827	LL1087	LL1723	A27	LL626	LL794
1a	αNADL	<b>660<sup>a</sup></b>	512 <sup>a</sup>	400	125	190	50	140	71	59	46	35	110	46	92	16	5	8
	αSinger	160	<b>360<sup>b</sup></b>	280	30	3	2,5	4	2,5	3	2,5	<2	<2	3	10	3	5	<2
	αOregon	110	180	<b>770</b>	100	24	55	64	32	15	18	16	16	39	46	14	8	8
1b	αCH113	97	180	17	<b>350</b>	80	180	290	46	65	71	71	59	46	42	35	50	25
	αCH1025	20	51	10	128	<b>128</b>	91	128	6	5	50	21	17	30	54	2,5	5	<2
	αA390	97	42	59	60	280	<b>350</b>	200	65	120	220	200	180	80	200	128	64	64
	αA474	350	50	170	860	44	160	<b>860</b>	3	2,5	4	3	6	3	12	4	5	<2
1e	αCH511	8	5	2	2,5	2,5	<2	<2	<b>128</b>	92	11	110	120	92	77	2,5	<2	2,5
	αA2	51	14	2,5	33	8	65	11	170	<b>740</b>	112	740	520	447	680	2,5	<2	<2
	αA290	87	87	100	128	71	128	58	128	80	<b>160</b>	145	71	125	128	2,5	<2	<2
	αA502	23	20	10	10	18	16	8	660	930	80	<b>960</b>	960	890	960	20	9	7
	αLL827	55	30	16	56	92	31	43	280	480	500	350	<b>665</b>	320	280	64	32	16
	αLL1087	16	20	10	11	60	35	12	160	240	100	170	240	<b>240</b>	92	32	14	28
	αLL1723	12	14	10	19	20	9	4,3	160	440	56	390	340	447	<b>570</b>	10	2,5	<2
2a	αA27	4	2,5	3,6	4	2,5	2	4,2	<2	3	3	<2	<2,5	<2	4	<b>170</b>	160	170
	αLL626	<2	2,5	2,5	<2	2,5	2	<2	<2	3	<2	<2	<2	<2	<2	32	<b>80</b>	32
	αLL794	2,5	2,5	2,5	3	2,5	4,2	2	2,5	2,5	<2	<2	2	<2	2	128	180	<b>240</b>

<sup>a</sup> Títulos de anticuerpos expresados como dosis protectora (DP<sub>50</sub>).

<sup>b</sup> Títulos de anticuerpos de sueros homólogos (valores en negrita).

CH: bovino - A: alpaca - LL: llama.

**Cuadro Nº 4.** Número de diluciones de diferencia en los títulos de anticuerpos entre la reacción homóloga y las reacciones heterólogas de cada uno de los sueros preparados contra las distintas cepas y aislados del virus diarrea viral bovina (VDVB)

odnbgns	Aislados Sueros anti	Genotipo 1												Genotipo 2				
		Subgrupo 1a			Subgrupo 1b				Subgrupo 1e						Subgrupo 2a			
		Cepa NADL	Cepa Singer	Cepa Oregon	CH113	CH1025	A390	A474	CH511	A2	A290	A502	LL827	LL1087	LL1723	A27	LL626	LL794
1a	αNADL	<b>660<sup>a</sup></b>	<1	<1	2	1	3	2	3	3	3	4	2	3	2	5	7	6
	αSinger	1	<b>360</b>	<1	3	6	7	6	7	6	7	7	7	6	5	6	6	7
	αOregon	2	2	<b>770</b>	2	5	3	3	4	5	5	5	5	4	4	5	6	6
1b	αCH113	1	<1	4	<b>350</b>	2	<1	<1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	3
	αCH1025	2	2	3	0	<b>128</b>	<1	0	4	4	1	2	2	2	2	5	4	5
	αA390	1	3	2	2	<1	<b>350</b>	<1	2	1	<1	<1	<1	2	<1	1	2	2
	αA474	2	4	2	0	4	2	<b>860</b>	8	8	7	8	7	8	6	7	7	8
1e	αCH511	4	4	6	5	5	6	6	<b>128</b>	<1	3	<1	<1	<1	<1	5	6	5
	αA2	3	5	8	4	6	3	6	2	<b>740</b>	2	0	<1	<1	<1	8	8	8
	αA290	<1	<1	<1	<1	1	<1	1	<1	1	<b>160</b>	<1	1	<1	<1	6	6	6
	αA502	5	5	6	6	5	5	6	<1	<1	3	<b>960</b>	0	<1	0	5	6	7
	αLL827	3	4	5	3	2	4	3	1	<1	<1	<1	<b>665</b>	1	1	3	4	5
	αLL1087	3	3	4	4	2	2	4	<1	0	1	<1	0	<b>240</b>	1	2	4	3
	αLL1723	5	5	5	4	4	5	7	1	<1	3	<1	<1	<1	<b>570</b>	5	7	8
2a	αA27	5	6	5	5	6	6	5	6	5	5	6	6	6	5	<b>170</b>	<1	0
	αLL626	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	1	<b>80</b>	1
	αLL794	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	6	6	6	<1	<1	<b>240</b>

<sup>a</sup>Títulos de anticuerpos de sueros homólogos (valores en negrita), expresados como dosis protectora (DP<sub>50</sub>).

CH: bovino - A: alpaca - LL: llama.

En el total de las reacciones heterólogas entre subgrupos (206), se constató que sólo 69 (33,5%) tuvieron diferencias en sus títulos menores a 4 diluciones y en 137 (66,5%) las diferencias de títulos fueron iguales o mayores a 4 diluciones (22 con diferencias en 4 diluciones, 48 con diferencias en 5 diluciones, 43 con diferencias en 6 diluciones, 14 con diferencias en 7 diluciones, y 10 con diferencias en 8 diluciones). Se destaca que los tres sueros anti aislados del subgrupo 2a (A27, LL626, LL794) al ser enfrentados a virus de otros subgrupos presentaron el mayor número de

diferencias de título, con variaciones de entre 4 y 6 diluciones con un promedio de 5,5 diluciones. En cuanto a los antisueros generados para el resto de los subgrupos, se observaron variaciones de título en relación a los valores homólogos de 4,6 (subgrupo 1a), 3,2 (subgrupo 1b) y 4,4 diluciones (subgrupo 1e) en promedio al ser enfrentados a virus heterólogos de subgrupos distintos (Cuadro N° 4).

Con respecto a los títulos promedios de aislados y cepas de los distintos subgrupos, estos fluctuaron entre 108,6 y 318 DP<sub>50</sub> para virus dentro de un mismo subgrupo y entre 1,5 y 60 DP<sub>50</sub> entre subgrupos distintos, resultando ser los valores de títulos promedios más bajos aquellos obtenidos al enfrentar sueros elaborados con aislados del subgrupo 2a a virus del resto de los subgrupos (1,5-2,5 DP<sub>50</sub>) y asimismo, a la inversa, al desafiar antisueros de los subgrupos 1a, 1b y 1e con virus del subgrupo 2a (5-11,6 DP<sub>50</sub>) (Cuadro N° 5).

**Cuadro N° 5.** Promedio de los títulos de anticuerpos neutralizantes en reacciones de seroneutralización cruzada entre cepas y aislados de distintos genotipos y subgrupos del virus diarrea viral bovina (VDVB)

Genotipo	Subgrupo	Aislados Sueros anti	Genotipo 1			Genotipo 2
			Subgrupo 1a	Subgrupo 1b	Subgrupo 1e	Subgrupo 2a
1	1a	αNADL αSinger αOregon	<b>318<sup>a</sup></b>	32,3 <sup>a</sup> (3,6)	15,3 (4,6)	5,9 (6)
	1b	αCH113 αCH1025 αA390 αA474	60 (2,2)	<b>183,9<sup>b</sup></b>	27,9 (3,2)	11,6 (4,1)
	1e	αCH511 αA2 αA290 αA502 αLL827 αLL1087 αLL1723	17 (4)	17,4 (3,9)	<b>234,4</b>	5 (5,6)
2	2a	αA27 αLL626 αLL794	2,5 (5,4)	2,3 (5,4)	1,5 (5,5)	<b>108,6</b>

<sup>a</sup> Títulos de anticuerpos expresados como dosis protectora (DP<sub>50</sub>).

<sup>b</sup> Títulos de anticuerpos frente a aislados del mismo subgrupo que el de los sueros (valores en negrita).

( ): Promedio de diluciones de diferencia en relación a la reacción homóloga.

CH: bovino - A: alpaca - LL: llama.

Al analizar los resultados de las reacciones de seroneutralización entre los aislados virales obtenidos de alpacas y llamas en relación a los aislados virales obtenidos de bovinos y las cepas de referencia empleadas en la elaboración de las vacunas comerciales, se pudo establecer que los sueros preparados a partir de los aislados virales A390 y A474 del subgrupo 1b obtenidos de alpacas, en sus reacciones homólogas mostraron títulos de 350 DP<sub>50</sub> y 860 DP<sub>50</sub>, respectivamente (Cuadro N° 3), y en las neutralizaciones heterólogas con aislados del mismo subgrupo las diferencias en los títulos fueron iguales o menores a dos diluciones, a excepción del suero αA474 que en la reacción con el aislado de bovino CH1025 del mismo subgrupo mostró una diferencia de título de cuatro diluciones (Cuadro N° 4). Este mismo suero (αA474) presentó diferencias de títulos neutralizantes de seis a ocho diluciones con los aislados del subgrupos 1e, de siete a ocho diluciones con los aislados del subgrupo 2a y de dos a cuatro diluciones con las cepas del subgrupo 1a. Todas estas diferencias de título fueron más altas que aquellas producidas entre las reacciones homólogas del resto de los sueros preparados con aislados del subgrupo 1b (αA390, αCH113 y αCH1025) y sus reacciones heterólogas con virus de los subgrupos 1a, 1b, 1e y 2a (Cuadro N° 4). En promedio, los aislados del subgrupo 1b estuvieron más relacionados antigénicamente con virus del subgrupo 1a y menos con los del subgrupo 2a (Cuadro N° 5 y Cuadro N° 7).

Los sueros generados a partir de los aislados virales obtenidos de las alpacas y llamas del subgrupo 1e, en sus reacciones homólogas mostraron títulos que fluctuaron de 160 a 960 DP<sub>50</sub> (Cuadro N° 3), y en las neutralizaciones heterólogas con aislados del mismo subgrupo, incluido el virus obtenido de bovino (CH511), las diferencias en los títulos fueron de cero a tres diluciones. En las neutralizaciones heterólogas con aislados de subgrupos diferentes, a excepción de las del suero αA290 con las cepas del subgrupo 1a y los aislados del 1b en que las diferencias de títulos estuvieron entre una y menos de una, las diferencias en los títulos en relación a la reacción homóloga fueron de tres a ocho diluciones frente a las cepas de referencia del subgrupo 1a, de dos a siete diluciones con los aislados de bovinos y de alpacas del subgrupo 1b, y entre dos y ocho diluciones con los aislados de alpacas y llamas de subgrupo 2a (Cuadro N° 4). En promedio, los

aislados del subgrupo 1e estuvieron antigénicamente más relacionados con los del subgrupo 1b y menos relacionados con los del subgrupo 2a (Cuadro N° 5 y Cuadro N° 7).

Los sueros elaborados con los aislados virales del subgrupo 2a obtenidos de alpacas y llamas, en sus reacciones homólogas mostraron títulos de 80, 170 y 240 DP<sub>50</sub> (Cuadro N° 3), y en las neutralizaciones heterólogas con aislados del mismo subgrupo las diferencias en los títulos fueron de cero a una dilución; mientras que en las neutralizaciones heterólogas con aislados de subgrupos diferentes las diferencias fueron las más marcadas, con entre cuatro y seis diluciones de distancia en los títulos seroneutralizantes con las cepas de referencia del subgrupo 1a, con los aislados de bovinos y de alpacas del subgrupo 1b, y con los aislados de alpacas, llamas y un bovino del subgrupo 1e (Cuadro N° 4). En promedio, los aislados del subgrupo 2a antigénicamente estuvieron muy poco relacionados con los virus de los subgrupos 1a, 1b y 1e (Cuadro N° 5 y Cuadro N° 7).

Con los títulos de anticuerpos neutralizantes de las reacciones homólogas y heterólogas de cada antisuero, fue posible calcular el Coeficiente de Similitud Antigénica (R) entre cada par o combinación de virus heterólogos, y de esta forma determinar cuán antigénicamente diversos son estos virus, siendo los valores de  $R \leq 25$  indicativos de diferencias antigénicas significativas (Archetti y Horsfall, 1950) (Cuadro N° 6).

De los 153 valores de R entre las diferentes cepas y aislados virales sólo 53 (34,64%) fueron mayores a 25, lo que indica que todas las combinaciones de virus restantes (100) (65,36%) mostraron diferencias antigénicas significativas (Cuadro N° 6).

Dentro de cada subgrupo genómico los valores de R fueron mayores a 25 en prácticamente todos los casos, excepto la combinación A474-CH1025 (aislados del subgrupo 1b) en que el R fue 23, indicativo de diferencias antigénicas significativas; además, se presentaron valores muy cercanos a 25 entre pares de virus ubicados dentro del subgrupo 1e (combinaciones A290-CH511; A290-A2; A290-A502 y A290-LL1723) (Cuadro N° 6).

Entre subgrupos genómicos, la mayoría de los valores de R (99/103) (96,11%) fueron menores a 25. Las únicas combinaciones entre subgrupos genómicos que entregaron valores

mayores a 25 correspondieron al aislado A290 del subgrupo 1e con los aislados CH113 (R=40), CH1025 (R=42) y A390 (R=71) del subgrupo 1b, y al aislado A474 del subgrupo 1b con la cepa NADL (R=29) del subgrupo 1a. De las 52 combinaciones de virus del subgrupo 1b con virus de subgrupos distintos, 4 (7,7%) presentaron un valor de  $R > 25$ ; una cifra mayor a la observada entre virus de los subgrupos 1a (1/42), 1e (3/70) y 2a (0/42) con virus del resto de los subgrupos genómicos (2,4%, 4,3% y 0%, respectivamente). Presentándose la mayoría de los valores de  $R > 25$  entre los subgrupos 1b y 1e (3/28) (10,7%). Para el VDVB-2a, no se observó ningún valor de R mayor a 25 para pares de virus ubicados dentro de diferentes subgrupos, por el contrario, varias de las combinaciones mostraron valores muy bajos (incluso un  $R=0$ ) denotando la débil similitud antigénica existente entre pestivirus de genotipos distintos. Sin embargo, en algunos casos las diferencias antigénicas entre virus de diferentes subgrupos dentro del mismo genotipo VDVB-1, alcanzaron valores de R similares a aquellas entre VDVB-1 y VDVB-2 (Cuadro N° 6).

Al analizar las similitudes antigénicas entre los aislados virales obtenidos de alpacas y llamas, con los aislados virales obtenidos de bovinos y las cepas que se utilizan en la elaboración de las vacunas comerciales, se encontró que dentro del subgrupo 1b los aislados obtenidos de alpacas (A390 y A474) no mostraron diferencias antigénicas significativas con virus del mismo subgrupo, sólo el aislado A474 fue significativamente diferente al aislado de bovino CH1025, también perteneciente al subgrupo 1b. En el subgrupo 1e, los aislados de alpacas, de llamas y el aislado de bovino no mostraron diferencias antigénicas significativas, aunque se presentaron valores muy cercanos a 25 entre los pares de virus A290-CH511, A290-A2, A290-A502 y A290-LL1723, con valores R de 26, 28, 27 y 28, respectivamente; demostrando que si bien las diferencias no fueron significativas, éstas estuvieron más cercanas a serlo que en el resto de las interacciones entre aislados de un mismo subgrupo (a excepción de la combinación entre A474 y CH1025) (Cuadro N° 6). En el subgrupo 2a, los aislados virales obtenidos de una alpaca y dos llamas fueron antigénicamente similares, pero en relación a los subgrupos del genotipo 1 las diferencias antigénicas fueron las más marcadas, con valores de R no superiores a siete (Cuadro N° 6).

**Cuadro N° 6.** Coeficiente de similitud antigénica (R) entre cepas y aislados de los distintos genotipos y subgrupos del virus diarrea viral bovina (VDVB)

Subgrupo	Cepas y aislados	Genotipo 1												Genotipo 2				
		Subgrupo 1a			Subgrupo 1b				Subgrupo 1e					Subgrupo 2a				
		Cepa NADL	Cepa Singer	Cepa Oregon	CH113	CH1025	A390	A474	CH511	A2	A290	A502	LL827	LL1087	LL1723	A27	LL626	LL794
1a	NADL	100	59	29	<b>23<sup>a</sup></b>	<b>21</b>	<b>14</b>	29	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>19</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
	Singer		100	43	<b>21</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
	Oregon			100	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
1b	CH113				100	48	30	91	<b>5</b>	<b>9</b>	40	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>3</b>
	CH1025					100	75	<b>23</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	42	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>24</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
	A390						100	33	<b>5</b>	<b>17</b>	71	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>
	A474							100	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
1e	CH511								100	41	26	77	63	69	41	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
	A2									100	28	98	71	78	84	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
	A290										100	27	58	57	28	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
	A502											100	73	81	83	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
	LL827												100	69	50	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
	LL1087													100	55	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>
	LL1723														100	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
2a	A27															100	61	73
	LL626																100	55
	LL794																	100

<sup>a</sup> Valores  $\leq 25$  indican diferencias estadísticamente significativas (valores en negrita).  
CH: bovino - A: alpaca - LL: llama.

El promedio de los valores de R de pares de virus pertenecientes a un mismo subgrupo fluctuaron entre 69,9 y 81,5; en tanto que en las combinaciones de virus de diferentes subgrupos los valores fueron menores a 25, evidenciándose una mayor diferencia antigénica entre aislados y cepas de los subgrupos 1a y 2a con un valor promedio de R de 1,4 y la menor diferencia antigénica entre los subgrupos 1a y 1b con un valor de 13,1 (Cuadro N° 7).

**Cuadro N° 7.** Valores promedio del coeficiente de similitud antigénica (R) entre distintos genotipos y subgrupos del virus diarrea viral bovina (VDVB)

		Genotipo 1			Genotipo 2
		Subgrupo 1a	Subgrupo 1b	Subgrupo 1e	Subgrupo 2a
Cepas	Subgrupo 1a	71,8	<b>13,1<sup>a</sup></b>	<b>5,1</b>	<b>1,4</b>
	Subgrupo 1b		70	<b>12,3</b>	<b>3,5</b>
Aislados	Subgrupo 1e				69,9
	Subgrupo 2a				81,5

<sup>a</sup> Valores  $\leq 25$  indican diferencias estadísticamente significativas (valores en negrita).

De acuerdo a los resultados obtenidos, este análisis confirma la existencia de diferencias antigénicas significativas entre subgrupos genómicos del VDVB.

## VIII.- DISCUSIÓN

Los sueros policlonales para cada uno de los aislados y cepas de referencia, obtenidos mediante la inoculación experimental en conejos, presentaron títulos de anticuerpos neutralizantes con sus virus homólogos que fluctuaron entre 80 y 960 DP<sub>50</sub> (Cuadro N° 3), valores que fueron suficientes para realizar las comparaciones antigénicas de este estudio. Sin embargo, estos títulos son menores a los reportados en investigaciones en que la elaboración de sueros hiperinmunes se ha realizado mediante inoculaciones experimentales de VDVB de diferentes genotipos y subgrupos en bovinos, caprinos, ovinos y porcinos, donde se obtienen valores que fluctúan entre 128 y 51.200 DP<sub>50</sub> (Pellerin *et al.*, 1994; Botton *et al.*, 1998; Carman *et al.*, 1998; Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Couvreur *et al.*, 2002; Fulton *et al.*, 2003a; Patel *et al.*, 2005; Bachofen *et al.*, 2008; Behera *et al.*, 2011). Los menores títulos de anticuerpos logrados en la especie conejo podrían deberse a que este no es un hospedero natural del virus, a diferencia de los otros estudios donde los sueros han sido elaborados en las especies susceptibles de ser infectadas en forma natural con pestivirus. No obstante esto, la variabilidad en los títulos seroneutralizantes obtenida en los sueros de conejos, a pesar de haber sido inoculados con las mismas dosis de virus y siguiendo un mismo patrón de inoculación, también se presenta en las inoculaciones experimentales antes señaladas, de tal modo que es posible sostener que esta variación estaría condicionada a la respuesta inmune propia de cada animal inoculado y, además, podría atribuirse a una propiedad de cada uno de los virus para generar respuesta inmune en los animales.

En las reacciones de seroneutralización cruzadas se observó una menor variabilidad en los títulos de anticuerpos para las reacciones de los sueros que involucraban a aislados pertenecientes a un mismo subgrupo, siendo en su mayoría (44/66) diferencias de menos de una dilución (Cuadro N° 4). En el subgrupo 1a, constituido por las cepas de referencia NADL, Singer y Oregon, las diferencias de títulos de cada suero reaccionando con los virus heterólogos del mismo subgrupo fluctuaron entre <1 y 2 diluciones, lo que concuerda con los datos aportados en la mayoría de las investigaciones en que se comparan estas mismas cepas de referencia y también las que involucran

reacciones con aislados de campo del subgrupo 1a (Pellerin *et al.*, 1994; Carman *et al.*, 1998; Fulton *et al.*, 2003a; Patel *et al.*, 2005; Bachofen *et al.*, 2008). Dentro de este subgrupo, los coeficientes de similitud antigénica (R) tuvieron valores de 59 para la cepas NADL y Singer, 29 para las cepas NADL y Oregon y 43 para las cepas Singer y Oregon, denotando que no existen diferencias antigénicas significativas entre ellas (Cuadro N° 6). Para este mismo subgrupo (1a), en otros estudios se informan datos que permiten calcular para las cepas NADL y Singer valores de R de 50 (Botton *et al.*, 1998; Carman *et al.*, 1998) y de 46 (Fulton *et al.*, 2003a), no obstante, también se describen diferencias significativas con valores de R de 25 entre las cepas NADL y Oregon y de 18 para las cepas Singer y Oregon (Botton *et al.*, 1998).

En cuanto al subgrupo 1b, en 11 de 12 reacciones heterólogas las diferencias en relación a la reacción homóloga fueron de cero a dos diluciones, con valores de R que fluctuaron entre 30 y 91, a excepción del suero anti aislado de alpaca A474 que tuvo una diferencia mayor a cuatro diluciones entre el título de la reacción con su virus homólogo (860 DP<sub>50</sub>) y el de la reacción con el aislado de bovino CH1025 (44 DP<sub>50</sub>) con un valor de R de 23, hecho que permite considerar a estos dos aislados como virus con diferencias antigénicas significativas entre sí (Cuadro N° 4 y Cuadro N° 6). El antecedente de encontrar diferencias antigénicas significativas dentro de aislados del subgrupo 1b no ha sido descrito, por el contrario, en un único estudio que involucra a virus del subgrupo 1b, se da cuenta que las diferencias en los títulos neutralizantes fueron de una a dos diluciones con un valor de R de 100 (Couvreur *et al.*, 2002). Las diferencias encontradas en esta memoria, podrían atribuirse a un bajo reconocimiento de los epítopes neutralizables del aislado de bovino CH1025 por parte del suero anti virus de alpaca A474. Sin embargo, al analizar la reacción inversa, es decir cuando se enfrentó el suero αCH1025 contra el virus A474, el título que se obtuvo fue de 128 DP<sub>50</sub>, igual al del la reacción homóloga con el aislado CH1025. Esta situación podría significar que hubo un cambio o pérdida parcial de epítopes del virus A474 y que al estimular la respuesta inmune generó anticuerpos provistos de un menor número de sitios antigénicos que los anticuerpos elaborados a partir del virus CH1025, y por lo tanto son incapaces de bloquear todos los epítopes neutralizables del aislado CH1025, lo que ocasiona que los anticuerpos αA474

presenten una acción neutralizante más débil frente a dicho virus (Xue *et al.*, 1990). Por otro lado, el suero  $\alpha$ CH1025 sería capaz de reconocer los epítomos neutralizables del virus A474 y generar una respuesta inmune adecuada. La pérdida o alteración de epítomos del virus A474 se debería a cambios genéticos (mutación, delección o recombinación) de baja magnitud, debido a que producen cambios en la antigenicidad del virus, pero no así en el parentesco genómico entre ambos, ya que ambos virus se clasifican como parte del VDVB genotipo 1 subgrupo b. Si este cambio se debe a una cualidad individual del virus A474 o a causa de una adaptación del virus a un hospedador distinto, si se considera que la alpaca posiblemente haya sido contagiada con un virus de origen bovino, se desconoce y ameritaría un estudio más profundo.

En relación a los aislados del subgrupo 1e en 29/42 reacciones las diferencias fueron menores a una dilución; sólo hubo tres reacciones, que involucran al aislado de alpaca A290 en sus reacciones con los sueros anti aislado de bovino CH511, de alpaca A502 y de llama LL1723, que difieren en tres diluciones con respecto a la reacción con sus respectivos virus homólogos (Cuadro Nº 4), valores que si bien dan cuenta de diferencias antigénicas, estas no son suficientes para considerarlas como significativas ya que los valores de R fueron de 26, 27 y 28, respectivamente (Cuadro Nº 6). De todas formas, a pesar que las variaciones antigénicas no fueron significativas, es posible afirmar que existe variabilidad antigénica dentro de los aislados del subgrupo 1e. En la literatura no se describen estudios de variabilidad antigénica entre aislados del subgrupo 1e.

En el subgrupo 2a las diferencias de títulos de cada suero reaccionando con los virus heterólogos del mismo subgrupo fueron de menos de una y una dilución, con valores de R que fluctuaron entre 55 y 73, lo que permite señalar que no hubo diferencias antigénicas significativas entre los aislados pertenecientes al subgrupo 2a (Cuadro Nº 4 y Cuadro Nº 6). En otros estudios, se da cuenta de resultados similares para aislados del mismo subgrupo: Avalos-Ramírez *et al.*, (2001) obtuvieron un R de 89; Pellerin *et al.*, (1994), un R de 71; Behera *et al.*, (2011), un R de 50; y Patel *et al.*, (2005), un R mayor a 30.

En cuanto a las variaciones antigénicas de aislados y cepas pertenecientes a subgrupos distintos, de las 103 combinaciones sólo 4 (3,88%), pertenecientes al genotipo 1, presentaron un R

mayor a 25 indicativo de similitud antigénica (Cuadro N° 6). En tanto que las mayores diferencias antigénicas estuvieron entre los genotipos 1 y 2, con diferencias en los títulos de anticuerpos de hasta ocho diluciones (Cuadro N° 4). Al enfrentar virus del subgrupo 2a a antiseros elaborados para virus de los subgrupos 1a, 1b y 1e, se obtuvieron diferencias promedio de 6, 4,1 y 5,6 diluciones, respectivamente (Cuadro N° 5), y valores de R que no superan a 7 (Cuadro N° 6). Estas diferencias antigénicas significativas entre los genotipos 1 y 2 concuerdan con los resultados aportados por otros estudios (Pellerin *et al.*, 1994; Carman *et al.*, 1998; Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Couvreur *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2005; Bachofen *et al.*, 2008; Behera *et al.*, 2011).

Las diferencias en los títulos de anticuerpos de los subgrupos dentro del genotipo 1 (subgrupos 1a, 1b y 1e) fueron menores a las diferencias encontradas entre genotipos, de hecho hubo virus de diferentes subgrupos que no se mostraron significativamente diferentes dado que los valores de R fueron mayores a 25 (1a/1b = NADL/A474; 1e/1b = A290/CH113, A290/CH1025 y A290/A390) (Cuadro N° 6); no obstante, también se pudo detectar diferencias de ocho diluciones entre la reacción de un suero con su virus homólogo y las reacciones heterólogas con virus de otros subgrupos (Cuadro N° 4), presentándose las mayores diferencias entre los títulos de los sueros generados contra las cepas de referencia NADL, Singer y Oregon (subgrupo 1a) al ser enfrentados a aislados del subgrupo 1e, con una distancia de 4,6 diluciones en promedio (Cuadro N° 5). Al respecto Couvreur *et al.*, (2002), también observaron que algunos aislados de un subgrupo pueden ser antigénicamente diferentes a aislados de otro subgrupo o bien ser antigénicamente similares, ya que al comparar una cepa del subgrupo 1a (NADL) con dos del subgrupo 1b observaron valores de R de 6 y de 35 y las distancias en las reacciones diferentes fueron hasta de cinco diluciones. De igual modo, Carman *et al.*, (1998), detectan diferencia antigénica entre la cepa NADL (1a) y un aislado del subgrupo 1b con un R de 18, y semejanza entre la cepa Singer (1a) y el mismo aislado 1b con un valor de R de 35; y Bachofen *et al.*, (2008), al comparar dos aislados del subgrupo 1a con uno del subgrupo 1b no encontraron diferencias antigénicas significativas, con valores de R de 35 y 42, pero al confrontar los dos aislados del subgrupo 1a con uno del subgrupo 1e, identificaron diferencias significativas en uno de ellos (R=20 y R=34) y también entre un aislado 1e y un aislado

1b (R=23), señalando que cuando no hubo significancia en las diferencias, las distancias en los títulos de anticuerpos fueron entre una y menos de una dilución. Avalos-Ramírez *et al.*, (2001) detectaron diferencias antigénicas significativas con un valor de R de 24 entre un aislado 1a y uno 1b; y Pellerin *et al.*, (1994), al confrontar tres cepas del subgrupo 1a con una cepa del subgrupo 1b, describen diferencias que no alcanzaron a ser mayores a una dilución y obtienen valores de R mayores a 35. Ante estos antecedentes, pareciera ser que el parentesco genómico que define a los subgrupos, no necesariamente se correlaciona en un alto grado con el parentesco antigénico. De todas formas, al comparar los promedios de las distancias (número de diluciones de diferencia) entre los títulos homólogos de sueros de un determinado subgrupo y sus títulos heterólogos con aislados de otros subgrupos, se obtiene que las cepas del subgrupo 1a tienen más cercanía antigénica con los aislados del subgrupo 1b que con los aislados de los subgrupos 1e y 2a; del mismo modo, los aislados del subgrupo 1b tienen más cercanía con los aislados del subgrupo 1a que con los aislados de 1e y 2a; y los aislados del subgrupo 1e tienen igual cercanía con los aislados del subgrupo 1a y 1b y menor con los aislados del subgrupo 2a; mientras que los aislados del subgrupo 2a están antigénicamente distantes de los tres subgrupos 1a, 1b y 1e (Cuadro N° 5).

El análisis de los valores promedios de los coeficientes de similitud antigénica (R) para cada uno de los subgrupos refuerza el análisis anterior, ya que fueron mayores a 25 para cada uno de los subgrupos al comparar aislados pertenecientes a un mismo subgrupo, pero en todos los casos en que las reacciones comprometían aislados de subgrupos distintos los promedios fueron menores a 25, indicando la existencia de diferencias antigénicas significativas entre todos los subgrupos involucrados en este estudio (1a, 1b, 1e y 2a) (Cuadro N° 7). El valor de R promedio de 13,1 de las reacciones entre los subgrupos 1a y 1b, resulta ser mucho más bajo que los valores reportados por Avalos-Ramírez *et al.*, (2001) y Bachofen *et al.*, (2008), que obtuvieron promedios de 24,2, y 38,5, respectivamente; hecho que llevaría a pensar que los aislados obtenidos mayoritariamente de camélidos sudamericanos presentan un comportamiento antigénico más distinto al confrontarlos a las cepas de referencia del subgrupo 1a, que lo descrito cuando se comparan aislados de bovinos. No obstante, es importante considerar que estos dos estudios, además de los efectuados por

Pellerin *et al.*, (1994), Carman *et al.*, (1998), Couvreur *et al.*, (2002), Fulton *et al.*, (2003a), Patel *et al.*, (2005) y Behera *et al.*, (2011), fueron realizados con un número de muestras de 1 a 6 virus (de los subgrupos que son de interés para esta memoria), en tanto que en esta investigación se analizaron 17 virus, una cantidad considerablemente superior y que permite un mayor número de combinaciones y reacciones de neutralización, lo que podría explicar, en cierta medida, las diferencias observadas entre éste y dichos estudios.

En general, las diferencias en los títulos de anticuerpos neutralizantes entre aislados de las distintas especies animales involucradas en este estudio (bovinos, alpacas y llamas) no fueron lo suficientemente importantes para provocar diferencias antigénicas significativas asociadas a la especie animal de origen, y que actúen de manera independiente a lo observado dentro de cada subgrupo y entre subgrupos. Sólo la combinación de los virus A474 y CH1025 presentó valores de R indicativos de diferencias antigénicas significativas dentro aislados de un mismo subgrupo, sin embargo se desconoce si el hecho de tratarse de aislados de distintas especies (alpaca y bovino) tiene un efecto en la presentación de estas diferencias. Además, de los cuatro valores de R indicativos de similitud antigénica ( $R > 25$ ) entre virus de subgrupos distintos, sólo uno se produjo en una combinación de virus que incluía aislados de la misma especie (A290/A390) (Cuadro N° 6). Por lo tanto, se podría asumir que lo que tiene una mayor correlación con la antigenicidad no sería la especie animal a partir de la cual los virus fueron aislados sino más bien el subgrupo genómico al que pertenecen.

Las diferencias antigénicas significativas encontradas entre las cepas de referencia (NADL, Singer y Oregon) del subgrupo 1a del VDVB con aislados pertenecientes al mismo virus pero de los subgrupos 1b, 1e y 2a obtenidos de bovinos, alpacas y llamas, así como la variabilidad antigénica observada dentro de los subgrupos, demuestran que existe una gran diversidad de VDVB infectando a estas poblaciones animales, lo que tiene varias implicancias. Una de ellas, es que el nivel protector conferido por la infección natural con un aislado del virus puede no ser suficiente para evitar una reinfección con una variante antigénica muy distinta. Del mismo modo, la protección conferida por las vacunas, que mayoritariamente son elaboradas con alguna de las

cepas de referencia del subgrupo 1a (sólo algunas contienen un virus del subgrupo 2a y sólo una contiene un virus del subgrupo 1b), debe ser capaz de generar títulos iguales o superiores a 256 DP<sub>50</sub> para prevenir la infección del feto (Ridpath, 2005b), ya que títulos menores previenen de la presentación de enfermedad pero no evitan la viremia (Bolin y Ridpath, 1995); y, si bien, las vacunas logran generar ese nivel de respuesta contra su virus homólogo, esta no sería suficiente para cubrir adecuadamente infecciones con cepas nativas de los otros subgrupos. Al respecto, varios antecedentes dan cuenta de que bovinos vacunados se han infectado con pestivirus (Bolin *et al.*, 1991; Ridpath *et al.*, 1994; Van Campen y Woodard, 1997; Van Oirschot *et al.*, 1999; Van Campen *et al.*, 2000), y se ha demostrado que vacunas atenuadas elaboradas con cepas del subgrupo 1a inducen una más baja respuesta de anticuerpos para cepas del subgrupo 1b, lo que sería de importancia debido a que las infecciones con VDVB-1b son tanto o más frecuentes que aquellas con virus del subgrupo 1a (Fulton *et al.*, 2003a; Van Amstel y Kennedy, 2010). En Chile, la frecuencia de aislamientos mayoritariamente corresponde a aislados de los subgrupos 1e y 1b en bovinos (Donoso, 2009) y 1e, 1b y 2a en camélidos sudamericanos domésticos (Beamín, 2009).

A pesar de que la vacunación de rebaños de alpacas y llamas no está recomendada, ya que se considera que la enfermedad no es un problema de amplia diseminación en estas especies (Kapil *et al.*, 2009), se ha demostrado experimentalmente la eficacia del suministro en CSA de vacunas fabricadas con cepas de VDVB-1a y VDVB-2, al lograr protección al ser enfrentado el animal a VDVB-1b (Byers *et al.*, 2010). De cualquier forma, si se pretende evaluar la eficacia de la protección conferida por las vacunas, la mejor manera de hacerlo es identificar las diferencias antigénicas *in vitro* y posteriormente realizar experimentos de protección cruzada *in vivo* (Dekker *et al.*, 1995).

Por último, es importante tener en consideración que el empleo de las cepas de referencia o antisueros de referencia (elaborados con las cepas de referencia) en el diagnóstico serológico y virológico puede conducir a resultados falsos negativos, en razón a la baja reactividad antigénica cruzada que se puede presentar con los aislados de campo.

## **IX.- CONCLUSIÓN**

En este estudio de comparación antigénica entre virus de distintos genotipos y subgrupos del virus de la diarrea viral bovina (VDVB), de acuerdo a los resultados obtenidos mediante reacciones de seroneutralización recíproca, se concluye que aislados nacionales del VDVB de los subgrupos 1b, 1e y 2a obtenidos a partir de camélidos sudamericanos domésticos (alpacas y llamas) de la Región Metropolitana y bovinos de las regiones Metropolitana y del Libertador General Bernardo O'Higgins, además de cepas de referencia del subgrupo 1a (NADL, Singer y Oregon) empleadas comúnmente para el diagnóstico y control de la enfermedad, presentan diferencias antigénicas significativas cuando se comparan aislados de distintos subgrupos, siendo particularmente marcadas entre genotipos; e incluso, se pudo constatar la existencia de diferencias antigénicas significativas entre un aislado de bovino y uno de alpaca pertenecientes a un mismo subgrupo genómico.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, G.; RATTO, M.; HUANCA, W.; SINGH, J.** 2005. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol Reprod.* 73: 452-457.
- ALVAREZ, S.; RIVERA, H.; PEZO, D.; GARCÍA, W.** 2002. Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Cachis, Cusco. *Rev Inv Vet Perú.* 13: 46-51.
- AMES, T.** 2005. Hosts. **In:** Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control.* Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 171-175.
- ARCE, C.** 2001. Infección por pestivirus en un rebaño de alpacas de la zona central de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 42 p.
- ARCHETTI, I.; HORSFALL, F.** 1950. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J Exp Med.* 92: 441-462.
- ARNAL, M.; FERNÁNDEZ-DE-LUCO, D.; RIBA, L.; MALEY, M.; GILRAY, J.; WILLOUGHBY, K.; VILCEK, S.; NETTLETON, P.** 2004. A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pirenaica pyrenaica*). *J Gen Virol.* 85: 3653-3657.
- AVALOS-RAMIREZ, R.; ORLICH, M.; THIEL, H.; BECHER, P.** 2001. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology.* 286: 456-465.
- BACHOFEN, C.; STALDER, H.; BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; PETERHANS, E.** 2008. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Vet Microbiol.* 131(1-2): 93-102.
- BADMAN, R.; MITCHELL, G.; JONES, R.; WESTBURY, H.** 1981. Association of bovine viral diarrhoea virus infection to hydrancephaly and other central nervous system lesions in perinatal calves. *Aust Vet J.* 57: 306-307.
- BAKER, J.** 1987. Bovine viral diarrhoea virus: A review. *J Am Vet Med Assoc.* 190: 1449-1458.
- BAKER, J.** 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 425-445.
- BEAMÍN, J.** 2009. Parentesco genómico de aislados de pestivirus obtenidos de ovejas, cabras, alpacas y llamas naturalmente infectadas mediante el análisis de una fracción del gen de la proteína e2. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 77 p.
- BECHER, P.; AVALOS, R.; ORLICH, M.; CEDILLO, S.; KÖNIG, M.; SCHWEIZER, M.; STALDER, H.; SCHIRMEIER, H.; THIEL, H.** 2003. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology.* 311: 96-104.
- BECHER, P.; ORLICH, M.; KOSMIDOU, A.; KÖNIG, M.; BAROTH, M.; THIEL, H.** 1999. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology.* 262: 64-71.

- BECHER, P.; ORLICH, M.; SHANNON, A.; HORNER, G.; KÖNIG, M.; THIEL, H.** 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol.* 78: 1357–1366.
- BECHER, P.; ORLICH, M.; THIEL, H.** 1998. Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol.* 72: 5165–5173.
- BECHER, P.; THIEL, H.** 2002. Genus *Pestivirus (Flaviviridae)*. **In:** Tidona, C.; Darai, G. (Eds.). *The Springer Index of Viruses.* Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. pp 327–331.
- BECKER, Y.** 2000. Evolution of viruses by acquisition of cellular RNA or DNA nucleotide sequences and genes: an introduction. *Virus Genes.* 21(1–2): 7–12.
- BEHERA, S.; MISHRA, N.; VILCEK, S.; RAJUKUMAR, K.; NEMA, R.; PRAKASH, A.; KALAIYARASU, S.; DUBEY, S.** 2011. Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolated from cattle in India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 34: 189–196.
- BELKNAP, E.; COLLINS, J.; LARSEN, R.; CONRAD, K.** 2000. Bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. *J Vet Diagn Invest.* 12: 568–570.
- BIELEFELDT-OHMANN, H.** 1983. Pathogenesis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. *Res Vet Sci.* 34: 5-10.
- BIELEFELDT-OHMANN, H.** 1984. An ocular-cerebellar syndrome caused by congenital viral diarrhoea virus-infection. *Acta Vet Scand.* 25: 36–49.
- BINKHORST, G.; JOURNEE, D.; WOUDA, W.; STRAVER, P.; VOS, J.** 1983. Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intrauterine infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Q.* 5: 145–155.
- BOLIN, S.** 2002. Bovine viral diarrhoea viruses in mixed infections. **In:** Brogden, K.; Guthmiller, J. (Eds.). *Polymicrobial diseases.* Washington, USA. ASM Press. pp 33–50.
- BOLIN, S.; LITLEDIKE, E.; RIDPATH, J.** 1991. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea viruses in a vaccinated herd. *American Journal Of Veterinary Research.* 52(7): 1033-1037.
- BOLIN, S.; MCCLURKIN, A.; CORIA, M.** 1985a. Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *Am J Vet Res.* 46: 2385–2387.
- BOLIN, S.; MCCLURKIN, A.; CUTLIP, R.; CORIA, M.** 1985b. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res.* 46: 573-576.
- BOLIN, S.; RIDPATH, J.** 1990. Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Am J Vet Res.* 51: 703–707.
- BOLIN, S.; RIDPATH, J.** 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am J Vet Res.* 53: 2157-2163.

- BOLIN, S.; RIDPATH, J.** 1995. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am J Vet Res.* 56: 755–759.
- BOLIN, S.; RIDPATH, J.** 1998. Prevalence of bovine viral diarrhea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J Vet Diagn Invest.* 10(2): 135–139.
- BOLIN, S.; RIDPATH, J.; BLACK, J.; MACY, M.; ROBLIN, R.** 1994. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhea virus. *J Virol Methods.* 48: 211–221.
- BONACIC, C.** 1991. Características biológicas y productivas de los Camélidos Sudamericanos. *Av Cs Vet.* 6: 3-15.
- BOTTON, S.; DA-SILVA, A.; BRUM, M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.** 1998. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Braz J Med Biol Res.* 31: 1429-1438.
- BOULANGER, D.; WAXWEILER, S.; KARELLE, L.; LONCAR, M.; MIGNON, B.; DUBUISSON, J.; THIRY, E.; PASTORET, P.** 1991. Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhea virus: Evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum. *J Gen Virol.* 72: 1195–1198.
- BRAUN, R.; OSBURN, B.; KENDRICK, J.** 1973. Immunologic response of bovine fetus to bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res.* 34: 1127–1132.
- BROCK, K.; DENG, R.; RIBLET, S.** 1992. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhea virus by RNA ligation and PCR. *J Virol Methods.* 38(1): 39–46.
- BROCK, K.; GROOMS, D.; GIVENS, D.** 2005. Reproductive Disease and Persistent Infections. In: Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). *Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management and control.* Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 145–156.
- BROES, A.; WELLEMANS, G.; DHEEDENE, J.** 1992. Syndrome hémorragique chez des bovins infectés par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD/MD). *Ann Méd Vét.* 137: 33-38.
- BROWN, B.** 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sci.* 58: 169-195.
- BROWN, T.; DE LAHUNTA, A.; BISTNER, S.; SCOTT, F.; MCENTEE, K.** 1975. Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhea virus. II. Ocular lesions. *Vet Pathol.* 12: 394–404.
- BROWN, T.; SHULTZ, A.; DUNCAN, J.; BISTNER, S.** 1979. Serological response of the bovine fetus to bovine viral diarrhea virus. *Infect Immun.* 25: 93-97.
- BROWNLIE, J.** 1985. Clinical aspects of the bovine virus diarrhea mucosal disease complex in cattle. *In Pract.* 7: 195-202.
- BROWNLIE, J.** 1991. The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of the disease. *Arch Virol Suppl.* 3: 79-96.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.; HOWARD, C.** 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec.* 114: 535-536.

- BYERS, S.; EVERMANN, J.; BRADWAY, D.; PARISH, S.; BARRINGTON, G.** 2010. Evaluation of a commercial bovine viral diarrhoea virus vaccine in nonpregnant female alpacas. *Vaccine*. 28: 591-593.
- CARDELLINO, R.; MUELLER, J.** 2008. Wool and other animal fibers in South America. **In:** *Proceedings of the Symposium on Natural Fibres*. Rome, Fao, Technical Paper. 56: 43-52.
- CARMAN, S.; CARR, N.; DELAY, J.; BAXI, M.; DEREGT, M.; HAZLETT, M.** 2005. Bovine viral diarrhoea virus in alpaca: abortion and persistent infection. *J Vet Diagn Invest*. 17: 589-593.
- CARMAN, S.; VAN DREUMEL, T.; RIDPATH, J.; HAZLETT, M.; ALVES, D.; DUBOVI, E.; TREMBLAY, R.; BOLIN, S.; GODKIN, A.; ANDERSON, N.** 1998. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest*. 10: 27-35.
- CARR, N.; CARMAN, S.** 2005. BVD Virus: A newly recognized serious health problem for alpacas. *Alpacas Magazine*. 31: 107-112.
- CASARO, A.; KENDRICK, J.; KENNEDY, P.** 1971. Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Am J Vet Res*. 32: 1543-1562.
- CELEDÓN, M.; 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.
- CELEDON, M.; SANDOVAL, A.; DROGUETT, J.; CALFIO, R.; ASCENCIO, L.; PIZARRO, J.; NAVARRO, C.** 2001. Survey for antibodies to pestivirus and herpesvirus in sheep, goats, alpacas (*Lama pacos*) guanacos (*Lama guanicoe*) and vicuna (*Vicugna vicugna*) from Chile. *Arch Med Vet*. 33: 162-175.
- CHASE, C.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A.** 2004. The immune response to bovine viral diarrhoea virus: A constantly changing picture. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract*. 20: 95-114.
- CHILDS, T.** 1946. X disease of cattle—Saskatchewan. *Can J Comp Med*. 10: 316-319.
- COLLETT, M.** 1996. Genomic structure of BVDV. **In:** *Program and Abstracts of the International Symposium Bovine Viral Diarrhoea Virus: A 50 year review*. Ithaca, NY. Cornell University Press. pp 18-23.
- COLLETT, M.; ANDERSON, D.; RETZEL, E.** 1988a. Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the Flaviviridae. *J Gen Virol*. 69: 2637-2643.
- COLLETT, M.; LARSON, R.; GOLD, C.; STRICK, D.; ANDERSON, D.; PURCHIO, A.** 1988b. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*. 165: 191-199.
- CONSTABLE, P.; HULL, B.; WICKS, J.; MYER, W.** 1993. Femoral and tibial fractures in a newborn calf after transplacental infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec*. 132: 383-385.
- CORAPI, W.; ELLIOTT, R.; FRENCH, T.; ARTHUR, D.; BEZEK, D.; DUBOVI, E.** 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc*. 196: 590-596.

- CORAPI, W.; FRENCH, T.; DUBOVI, E.** 1989. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Virol.* 63: 3934–3943.
- COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; COLLARD, A.; QUENON, P.; DEHAN, P.; HAMERS, C.; PASTORET, P.; KERKHOFS, P.** 2002. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res.* 85: 17–28.
- DANUSER, R.; VOGT, H.; KAUFMANN, T.; PETERHANS, E.; ZANON, R.** 2009. Seroprevalence and characterization of pestivirus infections in small ruminants and new world camelids in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde.* 151: 109–117.
- DEKKER, A.; WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.** 1995. Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross neutralization assays. *Vet Microbiol.* 47: 317-329.
- DENG, R.; BROCK, K.** 1993. 5' and 3' untranslated regions of the pestivirus genome: Primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acid Res.* 21: 1949–1957.
- DEREGT, D.** 2005. Introduction and history. **In:** Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control.* Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 3–33.
- DEREGT, D.; BOLIN, S.; VAN DEN HURK, J.; RIDPATH, J.; GILBERT, S.** 1998a. Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhoea virus with neutralization escape mutants. *Virus Res.* 53: 81–90.
- DEREGT, D.; TESSARO, S.; BAXI, M.; BEREZOWSKI, J.; ELLIS, J.; WU, J.; GILBERT, S.** 2005. Isolation of bovine viral diarrhoea viruses from bison. *Vet Rec.* 157: 448-450.
- DEREGT, D.; VAN RIJN, P.; WEINS, T.; VAN DEN HURK, J.** 1998b. Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhoea virus define three antigenic domains involved in neutralization. *Virus Res.* 57: 171–181.
- DONE, J.; TERLECKI, S.; RICHARDSON, C.; HARKNESS, J.; SANDS, J.; PATTERSON, D.; SWEASEY, D.; SHAW, I.; WINKLER, C.; DUFFELL, S.** 1980. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet Rec.* 106: 473–479.
- DONIS, R.; CORAPI, W.; DUBOVI, E.** 1988. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J Gen Virol.* 69: 77–86.
- DONIS, R.; DUBOVI, E.** 1987. Glycoproteins of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in infected bovine cells. *Journal of General Virology.* 68: 1607-1616.
- 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. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 66 p.
- DOYLE, L.; HEUSCHELE, W.** 1983. Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants. *J Am Vet Med Assoc.* 183: 1257–1259.

- DRAKE, T.; MOORE, D.; WHITLOCK, R.; CASTRO, A.; HAT-TEL, A.; REAMS, R.; STOFFREGEN, W.** 1996. An outbreak of acute BVD in Pennsylvania cattle. *Int Symp Bovine Viral Diarrhea Virus: A 50 Year Review* June 23–25. Ithaca, New York. pp 208.
- DUFFELL, S.; HARKNESS, J.** 1985. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec.* 117: 240–245.
- DUFFELL, S.; SHARP, M.; BATES, D.** 1986. Financial loss resulting from BVD-MD virus infection in a dairy herd. *Vet Rec.* 118: 38–39.
- ELLIS, J.; DAVIS, W.; BELDEN, E.; PRATT, D.** 1988. Flow cytofluorimetric analysis of lymphocyte subset alteration in cattle infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Pathol.* 25: 231–236.
- ESPINASSE, J.; PARODI, A.; CONSTANTIN, A.; VISO, M.; LAVAL, A.** 1986. Hyena disease in cattle: A review. *Vet Rec.* 118: 328–330.
- EVERMANN, J.** 2006. Pestiviral infection of llamas and alpacas. *Small Rum Res.* 61: 201-206.
- EVERMANN J, BARRINGTON, G.** 2005. Clinical features. **In:** Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control.* Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 105-120.
- FAO.** 2005a. 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: 01-09-2010].
- FAO.** 2005b. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. 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/2914per.pdf>> [consulta: 01-09-2010].
- FIA.** 2000. Camélidos en Chile, situación actual y perspectivas. L. A. Raggi. Editado por Gobierno de Chile. Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. 130 p.
- FLORES, E.; RIDPATH, J.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.; GIL L.** 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.* 87: 51–60.
- FOSTER, A.; HOULIHAN, M.; HOLMES, J.; WATT, E.; HIGGENS, R.; ERRINGTON, J.; IBATA, G.; WAKELEY, P.** 2007. Bovine viral diarrhoea virus infection of alpacas (*Vicugna pacos*) in the UK. *Vet Rec.* 161: 94–99.
- FOWLER, M.** 1998. *Medicine and surgery of South American Camelids.* Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco. Iowa, USA. Ames, Iowa State University Press. 391 p.
- FRANKLIN, W.** 1982. Biology, ecology and relationship to man of the South American camelids. **In:** *Mamalian biology in South America.* M.A. Mares y H.H. Genoways (eds.). Lab. of Ecol. and Univ. of Pittsburg, Pittsburg. Vol. Pymatuning Symp. Ecol. Spec. Publ. 6: 457-489.

- FREDRIKSEN, B.; PRESS, C.; LOKEN, T.; ODEGAARD, S.** 1999. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol.* 64: 109–122.
- FUENTES, R.** 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. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 39 p.
- FULTON, R.** 2005. Vaccines. **In:** Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control.* Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 209–222.
- FULTON, R.; PURDY, C.; CONFER, A.; SALIKI, J.; LOAN, R.; BRIGGS, R.; BURGE, L.** 2000. Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res.* 64: 151–159.
- FULTON, R.; RIDPATH, J.; CONFER, A.; SALIKI, J.; BURGE, L.; PAYTON, M.** 2003a. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals.* 31: 89–95.
- FULTON, R.; RIDPATH, J.; ORE, S.; CONFER, A.; SALIKI, J.; BURGE, L.; PAYTON, M.** 2005. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet Microbiol.* 111: 35–40.
- FULTON, R.; STEP, D.; RIDPATH, J.; SALIKI, J.; CONFER, A.; JOHNSON, B.; BRIGGS, R.; HAWLEY, R.; BURGE, L.; PAYTON, M.** 2003b. Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and Mannheimia haemolytica bacterin-toxoid. *Vaccine.* 21: 2980–5.
- GILLESPIE, J.; BAKER, J.; MCENTEE, K.** 1960. A cytopathogenic strains of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet.* 50: 73–79.
- GOYAL, S.** 2005. Diagnosis. **In:** Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control.* Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 197–208.
- GOYAL, S.; BOULJIHAD, M.; HAUGERUD, S.; RIDPATH, J.** 2002. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from an alpaca. *J Vet Diagn Invest.* 14: 523–525.
- GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B.; MOENNIG, V.** 2003. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals.* 31: 113–118.
- GREISER-WILKE, I.; HAAS, L.; DITTMAR, K.; LIESS, B.; MOENNIG, V.** 1993. RNA insertions and gene duplications in the nonstructural protein p125 region of pestivirus strains and isolates in vitro and in vivo. *Virology.* 193: 977–980.
- GRONDAHL, C.; UTTENTHAL, A.; HOUE, H.; RASMUSSEN, T.; HOYER, M.; LARSEN, L.** 2003. Characterization of pestivirus isolated from a persistently infected mousedeer (*Tragulus javanicus*). *Arch Virol.* 148: 1455–1463.
- HAFEZ, S.; LIESS, B.** 1972. Studies on bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. II. Stability and some physico-chemical properties. *Acta Virol.* 16: 399–408.

- HAINES, D.; CLARKE, E.; DUBOVI, E.** 1992. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet Pathol.* 29: 27–32.
- HAINES, D.; MARTIN, K.; CLARK, E.; JIM, G.; JANZEN, E.** 2001. The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhoea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *Can Vet J.* 42: 857–860.
- HAMBLIN, C.; HEDGER, R.** 1979. The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in African wildlife. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2: 295–303.
- HEINZ, F.; COLLET, M.; PURCELL, R.; GOULD, E.; HOWARD, C.; HOUGHTON, M.; MOORMANN, R.; RICE, C.; THIEL, H.** 2000. Family Flaviviridae. **In:** Van Regenmortel, M.; Fauquet, C.; Bishop, D.; Carstens, E.; Estes, M.; Lemon, S.; Maniloff, J.; Mayo, M.; McGeoch, D.; Pringle, C.; Wickner, R. (Eds). *Virus Taxonomy; classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* London, England. Academic Press. pp 859–879.
- HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; TRAUTWEIN, G.** 1994. Changes in porencephaly, hydranencephaly and leukoencephalopathy in ovine fetuses following transplacental infection with bovine virus diarrhoea virus: Distribution of viral antigen and characterization of cellular response. *Acta Neuropathol.* 87: 385–397.
- HORZINEK, M.** 1991. Pestiviruses - taxonomic perspectives. *Arch Virol Suppl.* 3: 1-5.
- HORZINEK, M.; MAESS, J.; LAUFS, R.** 1971. Studies on the substructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea, and hog cholera viruses. *Arch Gesamte Virusforsch.* 33: 306–318.
- HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V.** 2006. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest.* 18: 427–436.
- HOUE, H.; MYRUP-PEDERSEN, K.; MEYLING, A.** 1993. The effect of bovine virus diarrhoea virus infection on conception rate. *Prev Vet Med.* 15: 117–123.
- HOWARD, C.** 1990. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev Sci Tech.* 9: 95-103.
- HOWARD, C.; BROWNLIE, J.; CLARKE, M.** 1987. Comparison by the neutralisation assay of pairs of noncytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet Microbiol.* 13: 361–369.
- HUBALEK, Z.** 1982. Numerical comparative serology—the methods. *J Appl Bacteriol.* 52: 307–318.
- HULST, M.; MOORMANN, R.** 1997. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol.* 78: 2779–2787.
- INE.** 1997. VI Censo Nacional Agropecuario y Forestal. Instituto Nacional de Estadísticas ([www.ine.cl](http://www.ine.cl)). [en línea]  
<[http://www.ine.cl/canales/chile\\_estadistico/censos\\_agropecuarios/censos\\_agropecuarios.php](http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/censos_agropecuarios/censos_agropecuarios.php)> [consulta: 14-06-2010].

- INE.** 2007. VII Censo Nacional Agropecuario y Forestal: Enfoque estadístico. Boletín Informativo del Instituto Nacional de Estadísticas. [en línea]  
<[http://www.ine.cl/canales/sala\\_prensa/noticias/2007/marzo/files/septimo\\_censo\\_agropecuario\\_pdf.pdf](http://www.ine.cl/canales/sala_prensa/noticias/2007/marzo/files/septimo_censo_agropecuario_pdf.pdf)> [consulta: 14-06-2010].
- KABONGO, N.; BAULE, C.; VAN VUUREN, M.** 2003. Molecular analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from South Africa. *Onderstepoort. J Vet Res.* 70: 273–279.
- KABONGO, N.; VAN VUUREN, M.** 2004. Detection of bovine viral diarrhoea virus in specimens from cattle in South Africa and possible association with clinical disease. *J S Afr Vet Assoc.* 75: 90–93.
- KAHRS, R.; SCOTT, F.; DE LAHUNTA, A.** 1970. Congenital cerebella hypoplasia and ocular defects in calves following bovine viral diarrhoea-mucosal disease infection in pregnant cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 156: 1443–1450.
- KAPIL, S.; YEARY, T.; EVERMANN, J.** 2009. Viral diseases of new world camelids. *Vet Clin Food Anim.* 25: 323–337.
- KENDRICK, J.** 1971. Bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus infection in pregnant cows. *Am J Vet Res.* 11: 81–89.
- KIM, S.; ANDERSON, R.; YU, J.; ZYLICH, N.; KINDE, H.; CARMAN, S.; BEDENICE, D.; DUBOVI, E.** 2009. Genotyping and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from BVDV infected alpacas in North America. *Vet Microbiol.* 136: 209–216.
- KREY, T.; THIEL, H.; RUMENAPF, T.** 2005. Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *J Virol.* 79: 4191–4200.
- KUMMERER, B.; STOLL, D.; MEYERS, G.** 1998. Bovine viral diarrhoea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. *J Virol.* 72: 4127–4138.
- LAMBOT, M.; DOUART, A.; JORIS, E.; LETESSON, J.; PASTORET, P.** 1997. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol.* 78: 1041–1047.
- 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.
- LARSSON, B.; JACOBSSON, S.; BENGTSSON, B.; ET AL.** 1991. Alenius Summer Congenital curly haircoat as a symptom of persistent infection with bovine virus diarrhoea virus in calves. *Arch Virol Suppl.* 3: 143–148.
- LECOT, S.; BELOUZARD, S.; DUBUISSON, J.; ROUILLE, Y.** 2005. Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 79: 10826–10829.
- LEE, K.; GILLESPIE, J.** 1957. Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. *Am J Vet Res.* 18: 952–953.
- LIANG, D.; SAINZ, I.; ANSARI, I.; GIL, L.; VASSILEV, V.; DONIS, R.** 2003. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J Gen Virol.* 84: 1269–1274.

- LIESS, B.** 1990. Bovine viral diarrhoea virus. **In:** Dinter, Z.; Morein, B. (Eds). Virus Infections of Ruminants. Uppsala, Sweden. Elsevier Science Publishers. pp 247–266.
- LINDENBACH, B.; THIEL, H.; RICE, C.** 2007. Flaviviridae: The Virus and their Replication. **In:** Knipe, D.; Howley, P. Fields Virology. 5<sup>th</sup> Edition. Philadelphia, USA. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins (Ed). pp 1101-1152
- LINNAEUS, C.** 1758. Systema Naturae per Regna tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis. Editio decima, reformata, Holmiae, Laurentii Salvii. 824 pp.
- LUDWIG, J.; MCCLURKIN, A.** 1981. BVD in a Minnesota white-tailed deer. Wildl Dis Assoc Mtg Abstracts. 38 p.
- MALMQUIST, W.** 1968. Bovine viral diarrhoea-mucosal disease: etiology, pathogenesis and applied immunity. J Am Vet Med Assoc. 152: 763–768.
- MARTIN, S.; NAGY, E.; ARMSTRONG, D.; ROSENDAL, S.** 1999. The association of viral and mycoplasmal antibody titers with respiratory disease and weight gain in feedlot calves. Can Vet J. 40: 560–568.
- MATTSON, D.** 1994. Viral diseases, update on Llama medicine. Vet Clin North Am. 10: 346-347.
- MATTSON, D.; BAKER, R.; CATANIA, J.; IMBUR, S.; WELLEJUS, K.; BELL, R.** 2006. Persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in an alpaca. J Am Vet Med Assoc. 228: 1762–1765.
- MCCLURKIN, A.; BOLIN, S.; CORIA, M.** 1985. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. J Am Vet Med Assoc. 186: 568-569.
- MCGOWAN, M.; KIRKLAND, P.** 1995. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. Br vet J. 151: 263–270.
- MEYERS, G.; RÜMENAPF, T.; THIEL, H.** 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. Virology. 171: 555–567.
- MEYERS, G.; TAUTZ, N.; BECHER, P.; THIEL, H.; KÜMMERER, B.** 1996. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses from cDNA constructs. J Virol. 70: 8606–8613.
- MIEKKA, S.; BUSBY, T.; REID, B.; POLLOCK, R.; RALSTON, A.; DROHAN, W.** 1998. New methods for inactivation of lipid-enveloped and non-enveloped viruses. Haemophilia. 4: 402–408.
- MILLS, J.; LUGINBUHL, R.** 1968. Distribution and persistence of mucosal disease virus in experimentally exposed calves. Am J Vet Res. 29: 1367-1375.
- MIRANDA, M.** 2000. Determinación ultrasonográfica de los periodos de pérdidas embrio-fetales durante la gestación en alpacas (*Lama pacos*). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 66 p.

- MOENNIG, V.; GREISER-WILKE, I.; FREY, H.; HAAS, L.; LIEBLER, E.; POHLENZ, J.; LIESS, B.** 1993. Prolonged persistence of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in a persistently viremic cattle. *J Vet Med.* 40: 371-377.
- MOLINA, J.** 1782. Saggio sulla storia naturale del Chili. Tommaso d'Aquino, Bologna, Italy. 306 pp.
- MOORMANN, R.; HULST, M.** 1988. Hog cholera virus: identification and characterization of the viral RNA and the virus-specific RNA synthesized in infected swine kidney cells. *Virus Res.* 11: 281-291.
- MSOLLA, P.; SINCLAIR, J.; NETTLETON, P.** 1988. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus in Tanzanian cattle. *Trop Anim Hlth Prod.* 20: 114-116.
- MÜLLER, P.** 1776. Erste Classe, Säugende Thiere. In Des Ritters Carl von Linné vollständiges Naturalsystem nach der zwölften Lateinischen Ausgabe. 1773-1776: pp 1-62 + 3 pls., Suppl., 384 pp., Register, 36 unnumbered pp. + 536 pp.
- MUÑOZ-ZANZI, C.; HIETALA, S.; THURMOND, M.; JOHNSON, W.** 2003. Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy calves. *Am J Vet Res.* 64: 358-365.
- MURPHY, F.** 1980. Togavirus morphology and morphogenesis. **In:** Schlesinger, R (ed). *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication.* New York, USA. Academic Press. pp 241-316.
- MURPHY, F.; GIBBS, E.; HORZINEK, M.; STUDDERT, M.** 1999. *Veterinary Virology.* 3rd ed. New York, USA. Academic Press. 629 p.
- NETTLETON, P.** 1990. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot.* 9: 131-150.
- OLAFSON, P.; MCCALLUM, A.; FOX, F.** 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36: 205-213.
- ORBAN, S.; LIESS, B.; HAFEZ, S.; FREY, H.; BLINDOW, H.; SASSE-PATZER, B.** 1983. Studies on transplacental transmissibility of bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus. *Zentralbl Vet Med B.* 30: 619-634.
- 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.
- PATEL, J.; DIDLICK, S.; QUINTON, J.** 2005. Variation in immunogenicity of ruminant pestiviruses as determined by the neutralisation assay. *Vet J.* 169: 468-472.
- PATON, D.; LOWINGS, J.; BARRETT, A.** 1992. Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhoea virus. *Virology.* 190: 763-772.
- PATON, D.; SANDS, J.; LOWINGS, J.; SMITH, J.; IBATA, G.; EDWARDS, S.** 1995. A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet Res.* 26: 92-109.

- 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.
- PERDRIZET, J.; REBHUN, W.; DUBOVI, E.; DONIS, R.** 1987. Bovine virus diarrhoea—clinical syndromes in dairy herds. *Cornell Vet*. 77: 46–74.
- PICTON, R.** 1993. Serologic survey of llamas in Oregon for antibodies to viral diseases of livestock [MS thesis]. Corvallis, Oregon State University. 52 p.
- PINTO, J.; JIMÉNEZ, C.; MARTÍN, C.; CID, M.** 2010. Camélidos sudamericanos: clasificación, origen y características. *RCCV*. 4: 23-36.
- 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.
- PIZARRO-LUCERO, J.; CELEDON, M.; NAVARRO, C.; ORTEGA, R.; GONZALEZ, D.** 2005. Identification of a pestivirus isolated from a freeranging pudu (*Pudu pudu*) in Chile. *Vet Rec*. 157: 292–294.
- PLOWRIGHT, W.** 1969. Other virus diseases in relation to the JP15 programme. **In:** Joint Campaign Against Rinderpest. Proceedings of the First Technical Review Meeting, Phase IV, Mogadiscio. Mogadiscio, Kenya. Organization of African Unity. pp 19–23.
- POTGEITER, L.** 1995. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract*. 11: 501–520.
- POTGIETER, L.; MCCRACKEN, M.; HOPKINS, F.; WALKER, R.** 1984. Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am J Vet Res*. 45: 687–690.
- PREUSS, T.; KAMSTRUP, S.; KYVSGAARD, N.; NANSEN, P.; MILLER, A.; LEI, J.** 1997. Comparison of two different methods for inactivation of viruses in serum. *Clin Diagn Lab Immunol*. 4: 504–508.
- PUNTEL, M.; FONDEVILLA, N.; VIERA, J.; O'DONNELL, V.; MARCOVECCHIO, J.; CAQRILLO, B.** 1999. Serological survey of viral antibodies in llamas (*Lama glama*) in Argentina. *J Vet Med*. 157: 157–161.
- QUADROS, V.; MAYER, S.; VOGEL, F.; WEIBLEN, R.; BRUM, M.; ARENHART, S.; FLORES, E.** 2006. A search for RNA insertions and NS3 gene duplication in the genome of cytopathic isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Braz J Med Biol Res*. 39: 935–944.
- RADOSTITS, O.; LITTLEJOHNS, I.** 1988. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. *Can Vet J*. 29: 513-528.
- RAMSEY, F.; CHIVERS, W.** 1953. Mucosal disease of cattle. *North Am Vet*. 34: 629–633.
- REBHUN, W.; FRENCH, T.; PERDRIZET, J.; DUBOVI, E.; DILL, S.; KARCHER, L.** 1989. Trombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. *J Vet Int Med*. 3: 42-46.

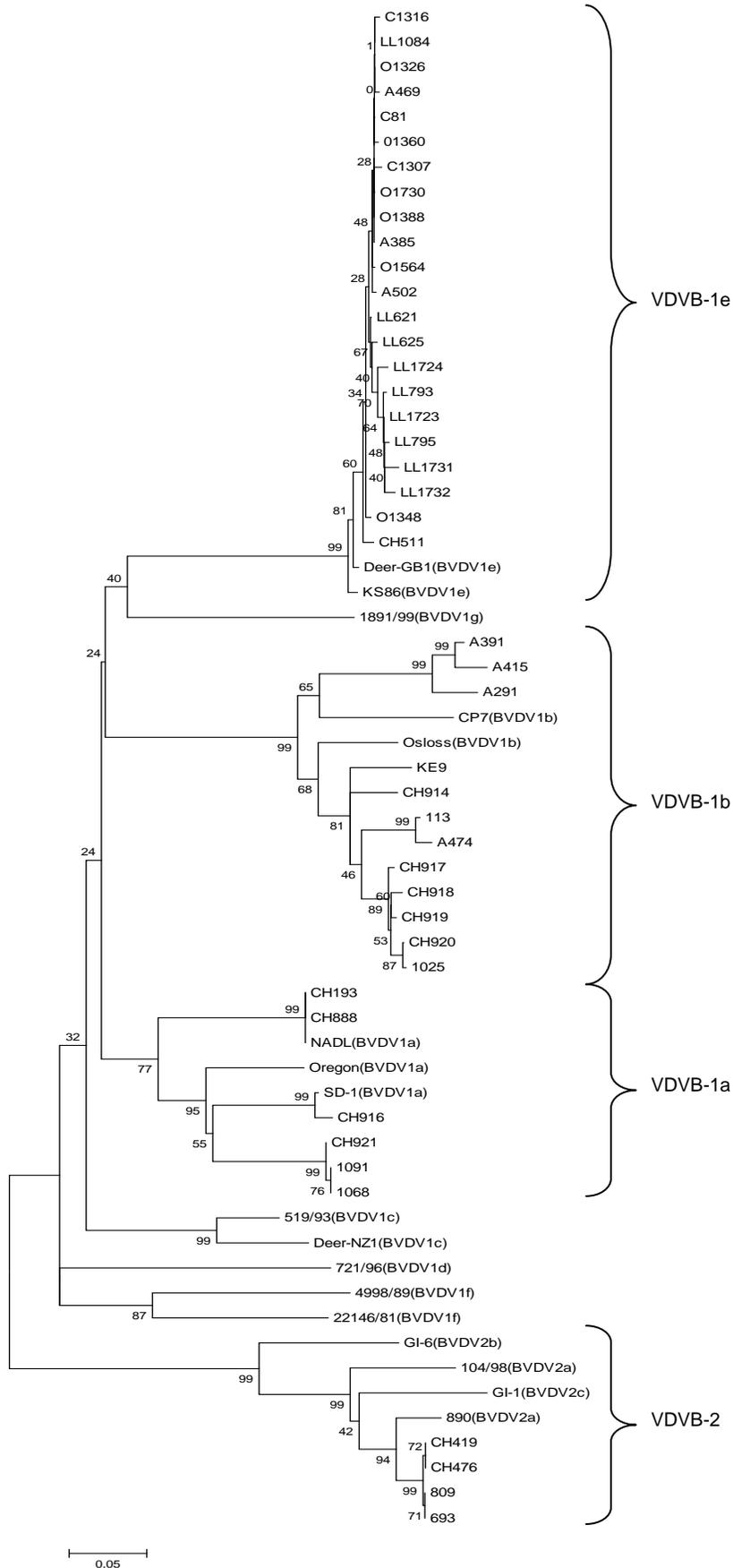
- REED, L.; MUENCH, H.** 1938. A simple method of estimating fifty-percent endpoints. *Am J Hyg.* 27: 493-497.
- RICHER, L.; MAROIS, P.; LAMONTAGNE, L.** 1988. Association of Bovine Viral Diarrhea Virus with Multiple Viral Infections in Bovine Respiratory Disease Outbreaks. *Can Vet J.* 29: 713-717.
- RIDPATH, J.** 2005a. Classification and molecular biology. **In:** Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control.* Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 65-80.
- RIDPATH, J.** 2005b. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev Vet Med.* 72: 17-30 [discussion: 215-9].
- RIDPATH, J.** 2010. Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. *Vet Clin Food Anim.* 26: 105-121.
- RIDPATH, J.; BOLIN, S.** 1991. Hybridization analysis of genomic variability among isolates of bovine viral diarrhoea virus using cDNA probes. *Mol Cell Probes.* 5: 291-298.
- RIDPATH, J.; BOLIN, S.** 1995. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology.* 212: 39-46.
- RIDPATH, J.; BOLIN, S.; DUBOVI, E.** 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology.* 205: 66-74.
- RIDPATH, J.; NEILL, J.; VILCEK, S.; NEILL, J.; VILCEK, S.; DUBOVI, E.; CARMAN, S.** 2006. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet Microbiol.* 114: 196-204.
- RIVERA, H.; MADEWELL, B.; AMEGHINO, E.** 1987. Serological survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama pacos*). *Am J Vet Res.* 48: 189-191.
- ROEDER, P.; JEFFREY, M.; CRANWELL, M.** 1986. Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequelae with fetal maturation. *Vet Rec.* 118: 44-48.
- ROMERO, S.; FUENZALIDA, L.** 1983. Manejo y uso de animales de laboratorio en procedimientos y técnicas de laboratorio. Instituto de Salud Pública de Chile. 1: 135-174.
- ROSSI, C.** 2004. Camélidos Sudamericanos. [en línea]  
<[http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/camelidos\\_rossi.htm](http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/camelidos_rossi.htm)> [consulta: 14-03-2011].
- SAG.** 2011. Medicamentos autorizados. Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura, Chile. [en línea]  
<[http://www.sag.gob.cl/OpenDocs/asp/pagDefault.asp?boton=Doc56&argInstanciaId=56&argCarpetaId=568&argTreeNodosAbiertos=\(0\)&argTreeNodoSel=568&argTreeNodoActual=568](http://www.sag.gob.cl/OpenDocs/asp/pagDefault.asp?boton=Doc56&argInstanciaId=56&argCarpetaId=568&argTreeNodosAbiertos=(0)&argTreeNodoSel=568&argTreeNodoActual=568)> [consulta: 18-10-2011].
- SÁNCHEZ, C.** 2004. Crianza y producción de alpacas. Lima, Perú. Ediciones Ripalme. 135p.
- SANDVIK, T.** 2004. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Vet clin North Am.* 20: 151-169.

- SCHELP, C.; GREISER-WILKE, I.; WOLF, G.; BEER, M.; MOENNIG, V.; LIESS, B.** 1995. Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection. *Arch Virol.* 140: 1997-2009.
- SCHWANTJE, H.; STEPHEN, C.** 2003. Communicable Disease Risks to Wildlife From Camelids in British Columbia. [en línea].  
<[http://www.env.gov.bc.ca/wld/documents/wldhealth/camelid\\_risk03.pdf](http://www.env.gov.bc.ca/wld/documents/wldhealth/camelid_risk03.pdf)> [consulta: 24-09-2010].
- SCOTT, F.; KAHR, R.; DE LAHUNTA, A.; BROWN, T.; MCENTEE, K.; GILLESPIE, J.** 1973. Virus-induced congenital anomalies of the bovine fetus. I. Cerebellar degeneration (hypoplasia), ocular lesions and fetal mummification following experimental infection with bovine viral diarrhoea mucosal disease virus. *Cornell Vet.* 63: 536-560.
- SCOTT, F.; KAHR, R.; PARSONSON, I.** 1972. A cytopathogenic strain of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus isolated from a bovine fetus. *Cornell Vet.* 62: 74-84.
- SOCKETT, D.; BOLIN, D.; RIDPATH, J.; BOLIN, S.** 1996. Outbreak of severe acute bovine virus diarrhoea (BVD) in Wisconsin. *Int Symp Bovine Viral Diarrhoea Virus: A 50 Year Review* June 23-25. Ithaca, New York. pp 207.
- SPAGNUOLO-WEAVER, M.; ALLAN, G.; KENNEDY, S.; FOSTER J.; ADAIR, B.** 1997. Distribution of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus antigens in tissues of calves following acute experimental infection. *J Vet Diagn Invest.* 9: 287-297.
- SPONHEIMER, M.; ROBINSON, T.; ROEDER, B.; HAMMER, J.; AYLIFFE, L.; PASSEY, B.; CERLING, T.; DEARING, D.; EHLERINGER, J.** 2003. Digestion and passage rates of grass hays by llamas, alpacas, goats, rabbits, and horses. *Small Ruminant Res.* 48: 149.
- STADEJEK, T.; VILCEK, S.; LOWINGS, J.; BALLAGI-PORDANY, A.; PATON, D.; BELAK, S.** 1997. Genetic heterogeneity of classical swine fever virus in Central Europe. *Virus Res.* 52: 195-204.
- STAHL, K.; KAMPA, J.; BAULE, C.; ISAKSSON, M.; MORENO-LOPEZ, J.; BELAK, S.; ALENIUS, S.; LINDBERG, A.** 2005. Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. *Prev Vet Med.* 72: 103-108.
- SUMAR, J.** 1997. Evolución y desarrollo de la ganadería camélida en el altiplano de Latinoamérica. **In:** El Altiplano, Ciencia y conciencia en los Andes. Actas del II Simposio Internacional de Estudios Altiplánicos 19 - 21 de Octubre de 1993, Arica - Chile. Vicerrectoría Académica y Estudiantil, Departamento de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile.
- TAUTZ, N.; THIEL, H.; DUBOVI, E.; MEYERS, G.** 1994. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol.* 68: 3289-3297.
- THIEL, H.; PLAGEMANN, P.; MOENING, V.** 1996. Pestiviruses. **In:** Knipe, D.; Howley, P. Fields Virology. Third Edition. Philadelphia, USA. Lippincott - Raven Publishers. pp 1059-1073.
- THURMOND, M.** 2005. Virus Transmission. **In:** Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control. Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 91-104.

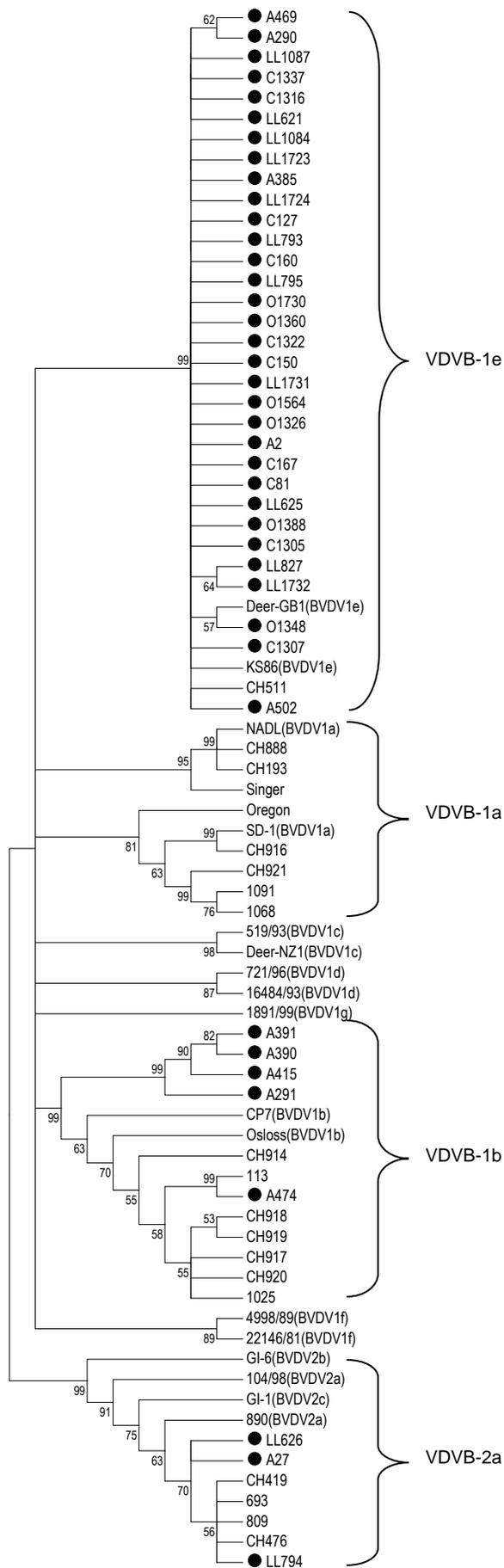
- TOPLIFF, C.; SMITH, D.; CLOUSER, S.; STEFFEN, D.; HENNINGSON, J.; BRODERSON, B.; BEDENICE, D.; CALLAN, R.; REGGIARDO, C.; KURTH, K.; KELLING, C.** 2009. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infections in alpacas in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 234: 519–529.
- UTTENTHAL, A.; GRONDAHL, C.; HOYER, M.; HOUE, H.; VAN MAANEN, C.; RASMUSSEN, T.; LARSEN, L.** 2005. Persistent BVDV infection in mousedeer infects calves. Do we know the reservoirs of BVDV?. *Prev Vet Med.* 72: 87–91.
- VALLE, P.; SKJERVE, E.; MARTIN, S.; LARSEN, R.; OSTERAS, O.; NYBERG, O.** 2005. Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Prev Vet Med.* 72: 189–207.
- VAN AMSTEL, S.; KENNEDY, M.** 2010. Bovine viral diarrhoea infections in new world camelids – A review. *Small Rum Res.* 91: 121-126.
- VAN CAMPEN, H.; RIDPATH, J.; WILLIAMS, E.; CAVENDER, J.; EDWARDS, J.; SMITH, S.; SAWYER, H.** 2001. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a freeranging mule deer in Wyoming. *J Wildl Dis.* 37: 306–331.
- VAN CAMPEN, H.; VORPAHL, P.; HUZURBAZAR, S.; EDWARDS, J.; CAVENDER, J.** 2000. Evidence for bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV)-associated disease in beef herds vaccinated with a modified-live type 1 BVDV vaccine. *J Vet Diagn Invest.* 12:263–265.
- VAN CAMPEN, H., WOODARD, L.** 1997. Fetal infection may not be preventable with BVDV vaccines. *J Am Vet Med Assoc.* 210: 480.
- VAN OIRSCHOT, J.; BRUSCHKE, C.; VAN RIJN, P.** 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol.* 64: 169–183.
- VAN RIJN, P.; VAN GENNIP, H.; LEENDERTSE, C.; BRUSCHKE, C.; PATON, D.; MOORMANN, R.; VAN OIRSCHOT, J.** 1997. Subdivision of the *Pestivirus* genus based on envelope protein E2. *Virology.* 237: 337–348.
- VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M.; GREISER-WILKE, I.; PATON, D.** 2004. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet Res.* 35: 609–615.
- VILCEK, S.; NETTLETON, P.** 2006. Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol.* 116: 1–12.
- VILCEK, S.; PATON, D.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEGA, S.; SCICLUNA, M.; PALFI, V.** 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol.* 146: 99–115.
- VILCEK, S.; PATON, D.; ROWE, L.; ANDERSON, E.** 2000. Typing of pestiviruses from eland in Zimbabwe. *J Wildl Dis.* 36: 165-168.
- VILCEK, S.; RIDPATH, J.; VAN CAMPEN, H.; CAVENDER, J.; WARG, J.** 2005. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res.* 108: 187–193.

- VIRAKUL, P.; FAHNING, M.; JOO, H.; ZEMJANIS, R.** 1988. Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain. *Theriogenology*. 29: 441–449.
- WALZ, P.; STEFICEK, B.; BAKER, J.** 1999. Effect of type II bovine viral diarrhoea virus on platelet function in experimentally infected calves. *Am J Vet Res*. 60: 1396–1401.
- WARD, G.; ROBERTS, S.; MCENTEE, K.; GILLESPIE, J.** 1969. A study of experimentally induced bovine viral diarrhoea-mucosal disease in pregnant cows and their progeny. *Cornell Vet*. 59: 525–538.
- WEBB, S.** 1974. Pleistocene Llamas of Florida, with a Brief Review of the Lamini. **In:** Pleistocene Mammals of Florida. Gainesville: The University Presses of Florida. Webb SD, ed. pp 170-213.
- WENTZ, P.; BELKNAP, E.; BROCK, K.; COLLINS, J.; PUGH, D.** 2003. Evaluation of bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. *J Am Vet Med Assoc*. 223: 223–228.
- WESTAWAY, E.; BRINTON, M.; GAIDAMOVICH, S.; HORZINEK, I.; IGARASHI, A.; KAARIAINEN, L.; LVOV, D.; PORTERFIELD, J.; RUSSELL, P.; TRENT, D.** 1985. Togaviridae. *Intervirology*. 24: 125-139.
- WHEELER, J.** 1991. Origen, evolución y status actual. **In:** Fernández-Baca, S (ed). Avances y perspectivas en el conocimiento de los camélidos sudamericanos. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Santiago, Chile. pp 11-48.
- WOHRMANN, T.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; FERNANDEZ, A.; MOENNIG, V.; LIESS, B.; TRAUTWEIN, G.** 1992. Distribution of bovine virus diarrhoea viral antigens in the central nervous system of cattle with various congenital manifestations. *Zentralbl Vet Med B*. 39: 599–609.
- XUE, W.; BLECHA, F.; MINOCHA, C.** 1990. Antigenic variations in bovine viral diarrhoea viruses detected by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 28: 1688-1693.
- XUE, W.; MINOCHA, C.** 1993. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J Gen Virol*. 74: 73–79.

**ANEXO 1**



**Figura 1.** 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 (O), cabras (C), alpacas (A) y llamas (LL), 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](http://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.



**Figura 2.** Árbol filogenético basado en un segmento de 201 nucleótidos correspondiente a un fragmento del gen que codifica para la proteína E2, pertenecientes a 77 aislados de pestivirus que incluye aislados de ovejas (O), cabras (C), alpacas (A) y llamas (LL), 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](http://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.

## ANEXO 2



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**Dirección Económica y Administrativa**

### CERTIFICADO

Con relación a los procedimientos de bioseguridad requeridos para desarrollar el proyecto "**Comportamiento genómico, antigénico y biológico de aislados de pestivirus importantes de conocer para el control de la infección en rumiantes de Chile**", cuyo investigador principal es la **Dra. Maria Orfelía Celedón Venegas**, se certifica que la Unidad de Virología donde se realizará dicho estudio cuenta con los requerimientos para trabajar con bioseguridad en pestivirus, de acuerdo a las recomendaciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), ya que cuenta con una unidad de trabajo cerrada y provista de descontaminación ambiental por irradiación con luz ultravioleta, donde se incluye una cámara de bioseguridad de doble protección "Ultrafase Microbiological Safety Cabinet Master 48" y además una sala de descontaminación provista de autoclave y personal idóneo para desempeñar este tipo de trabajo.

  
**JAIME PARADA MANRIQUEZ**  
Presidente Comité de Bioseguridad



Santiago, Junio 18 de 2007.-

### ANEXO 3



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

## CERTIFICADO N° 006

Con relación a los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales en el Proyecto FONDECYT (Concurso Regular 2008) titulado **“ANÁLISIS GENÓMICO, ANTIGÉNICO Y DE VIRULENCIA DE PESTIVIRUS OBTENIDOS DE RUMIANTES DOMÉSTICOS”**, cuyo Investigador Responsable es la Dra. María Orfelía Celedón V., el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile certifica que éste satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigaciones Biomédicas, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité.

  
Dr. HÉCTOR ALCAÍNO CONTADOR  
Decano  
Presidente  
Comité de Bioética Animal



Santiago, junio 15 de 2007