



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN ANTIGÉNICA ENTRE AISLADOS DE VIRUS
DIARREA VIRAL BOVINA OBTENIDOS DE OVINOS Y
CAPRINOS CON AISLADOS DE BOVINOS, CAMÉLIDOS
SUDAMERICANOS Y CEPAS DE REFERENCIA MEDIANTE
REACCIÓN DE SERONEUTRALIZACIÓN CRUZADA

ROBERTO JUAN IBARRA CELEDÓN

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

PROFESOR GUÍA: DRA. MARÍA ORFELIA CELEDÓN VENEGAS

Financiamiento proyecto **FONDECYT N° 1080130**



SANTIAGO, CHILE
2012

UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN ANTIGÉNICA ENTRE AISLADOS DE VIRUS
DIARREA VIRAL BOVINA OBTENIDOS DE OVINOS Y
CAPRINOS CON AISLADOS DE BOVINOS, CAMÉLIDOS
SUDAMERICANOS Y CEPAS DE REFERENCIA MEDIANTE
REACCIÓN DE SERONEUTRALIZACIÓN CRUZADA

ROBERTO JUAN IBARRA CELEDÓN

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

NOTA FINAL:

NOTA

FIRMA

PROFESOR GUÍA : MARÍA CELEDÓN V.

.....

PROFESOR CONSEJERO : JUAN LAZO Q.

.....

PROFESOR CONSEJERO : JOSÉ PIZARRO L.

.....

SANTIAGO, CHILE
2012

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Producción Ovina y Caprina en Chile.....	3
Virus Diarrea Viral Bovina	5
Descubrimiento y clasificación	5
Descripción del virus.....	5
Clasificación en biotipos, genotipos, subgrupos genómicos y grupos antigénicos	6
Infección de Especies Animales con Pestivirus	10
Efectos de la Infección por Pestivirus en Bovinos, Ovinos y Caprinos	10
Enfermedad de la Frontera	12
Control de Infecciones Producidas por Virus Diarrea Viral Bovina	14
Situación de la Infección por Virus Diarrea Viral Bovina en Chile.....	15
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
Muestras	18
Producción de Reservas Virales.....	18
Cuantificación de la Infectividad Viral	21
Elaboración de Sueros Hiperinmunes	22
Titulación de Sueros Hiperinmunes	22
Determinación de Antigenicidad Cruzada entre los Virus	23
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXO N° 1.....	55
ANEXO N° 2.....	56

RESUMEN

El Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) infecta al ganado biungulado generando considerables pérdidas productivas y reproductivas. Análisis filogenéticos segregan al VDVB en dos genotipos dentro del género *Pestivirus*, VDVB genotipo 1 (VDVB-1) y VDVB genotipo 2 (VDVB-2). Análisis filogenéticos posteriores han demostrado la existencia de subgrupos dentro de los dos genotipos. Al menos 15 subgrupos para el VDVB-1 (de a hasta o) y dos subgrupos para el VDVB-2 (a y b) han sido identificados.

Estudios previos han demostrado que en el ganado de Chile se han aislado los subgrupos VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1i, VDVB-1j y VDVB-2a en bovinos, VDVB-1b, VDVB-1j y VDVB-2a en camélidos sudamericanos y VDVB-1j en ovinos y caprinos.

Para conocer si existen diferencias antigénicas entre aislados chilenos del VDVB de los subgrupos VDVB-1j obtenidos de ovinos y caprinos, frente a aislados chilenos del VDVB de los subgrupos VDVB-1j y VDVB-1b obtenidos de bovinos, VDVB-2a obtenidos de camélidos sudamericanos y frente a cepas de referencia del subgrupo VDVB-1a, se produjeron sueros policlonales en conejos mediante inoculaciones de los aislados y cepas de referencia. Con los sueros inmunes se realizaron pruebas de seroneutralización cruzada enfrentando cada suero con los virus homólogos y heterólogos.

Los resultados demostraron que no hubo diferencias antigénicas significativas entre los aislados virales de ovinos, caprinos y bovinos del subgrupo VDVB-1j, y que hubo diferencias antigénicas significativas entre los virus de los subgrupos VDVB-1j, VDVB-1b, VDVB-2a y VDVB-1a.

Esta es la primera identificación antigénica de aislados de VDVB obtenidos de ovinos y caprinos de Chile, que puede tener implicaciones importantes en la epidemiología de la VDVB y debería ser considerada en programas de inmunización, prevención de infecciones dentro o entre especies y en el empleo de virus y sueros hiperinmunes como materiales de diagnóstico en los laboratorios.

SUMMARY

Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) infects biungulated livestock generating considerable productive and reproductive losses. Phylogenetic analysis divided BVDV into two different genotypes within the *Pestivirus* genus, BVDV genotype 1 (BVDV-1) and BVDV genotype 2 (BVDV-2). Further phylogenetic analysis has revealed subgroups within the two genotypes. Thus far, 15 BVDV-1 subgroups (from a to o) and two BVDV-2 subgroups (a and b) have been identified.

Previous studies have shown that BVDV subgroups have been isolated in Chilean livestock: BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1i, BVDV-1j and BVDV-2a in bovines, BVDV-1b, BVDV-1j and BVDV-2a in South American camelids (SAC) and BVDV-1j in sheep and goats.

To examine antigenic differences between the Chilean subgroups BVDV-1j isolates obtained from sheep and goats, and BVDV-1j and BVDV-1b isolates obtained from bovines, BVDV-2a isolates obtained from SAC and BVDV-1a reference strains, polyclonal antisera were produced in rabbits by exposing them to isolates and reference strains. With the antisera cross-neutralization assays were then performed against homologous and heterologous viruses.

The results showed that BVDV-1j isolates obtained from sheep, goats and bovines are antigenically homogeneous and that there are significant antigenic differences between BVDV-1j, BVDV-1b, BVDV-2a isolates and BVDV-1a reference strains.

This is the first antigenic identification of BVDV isolates from Chilean sheep and goats that may have important implications in the epidemiology of BVDV and should be considered for immunization programs, prevention of infection inside or between species, and in the usage of virus and hyperimmune sera as diagnostic material in laboratories.

INTRODUCCIÓN

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es el agente causal de enfermedades que producen importantes pérdidas económicas en el ganado, provocando un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones, siendo el daño reproductivo el más importante. El virus puede cruzar barreras de especie con relativa facilidad e infectar a otras especies domésticas y silvestres pertenecientes al orden Artiodactyla, como son bovinos, ovinos, caprinos, camélidos, porcinos, etc. Su distribución es mundial y es endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas, en parte gracias a la presencia de animales persistentemente infectados (PI) los que actúan como reservorio del virus.

En el ganado bovino, el VDVB está presente en la mayoría de los países, con prevalencias sobre el 60% de los animales, situación que también se presenta en Chile. Es responsable de producir la Diarrea Viral Bovina (DVB) que generalmente se presenta en terneros en forma leve o subclínica, pero en ocasiones cepas de alta virulencia generan enfermedades graves en animales de todas las edades. En la etapa reproductiva el VDVB causa infertilidad, muerte embrionaria, aborto y muerte perinatal. Los terneros pueden nacer con malformaciones congénitas, deficiencias en su desarrollo, mayor susceptibilidad de sufrir afecciones digestivas y respiratorias o con predisposición a sufrir la enfermedad de las mucosas (EM) si nacen PI. En el ganado ovino, caprino y en camélidos sudamericanos, el VDVB produce afecciones similares a las de los bovinos, pero la incidencia es menor. En particular, los ovinos y caprinos pueden sufrir, además, una afección similar a la producida por el virus de la enfermedad de la frontera (VEF), que se caracteriza por el nacimiento de corderos temblorosos y peludos que generalmente mueren al poco tiempo de nacer. En Chile, se ha detectado infección por VDVB tanto en ovinos, caprinos como en camélidos sudamericanos domésticos.

El VDVB se ubica en el género Pestivirus, familia Flaviviridae. Análisis filogenéticos del genoma viral muestran que existe variación en las secuencias de nucleótidos entre aislados. Las mayores variaciones permiten separar al VDVB en dos genotipos, VDVB genotipo 1 (VDVB-1) y VDVB genotipo 2 (VDVB-2); variaciones menores segregan al VDVB-1 en 15

subgrupos, VDVB-1a hasta el subgrupo VDVB-1o, y al VDVB-2 en los subgrupos VDVB-2a y VDVB-2b. Análisis antigénicos separan al VDVB en dos grupos que se asocian perfectamente con los genotipos VDVB-1 y VDVB-2. Si bien los dos genotipos comparten antígenos comunes, la mayoría de los epitopos de los antígenos neutralizables son diferentes, por lo que se produce una escasa o nula protección cruzada, debido a que estos antígenos son los que inducen la mejor respuesta protectora conferida por inmunidad natural o por vacunas. Las investigaciones de comparaciones antigénicas entre aislados de VDVB de algunos subgrupos genómicos obtenidos de bovinos entregan resultados dispares.

En Chile, mediante análisis de segmentos de la región no traducida 5'UTR (UTR del inglés *untranslated regions*) del genoma viral, se han identificado los subgrupos VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1i, VDVB-1j y VDVB-2a en bovinos; VDVB-1b, VDVB-1j y VDVB-2a en alpacas y llamas; y VDVB-1j en ovinos y caprinos. Los productores de ganado bovino aplican vacunas inactivadas que son elaboradas con cepas de VDVB-1a para controlar, fundamentalmente, las pérdidas reproductivas del ganado.

Dado el contacto que existe entre las diferentes especies del ganado doméstico en Chile, surge la necesidad de conocer las diferencias antigénicas que se presentan entre aislados VDVB-1j obtenidos de ovinos y caprinos con aislados de VDVB-1j y VDVB-1b obtenidos de bovinos, aislados de VDVB-2a obtenidos de camélidos sudamericanos y con cepas de VDVB-1a que contienen las vacunas que se aplican en Chile.

Esta memoria de título es una contribución al conocimiento de la inmunidad que pueden estar confiriendo diferentes genotipos y subgrupos frente a infecciones naturales con virus de otros subgrupos, y de la protección que podrían llegar a conferir vacunas elaboradas con VDVB, en la eventualidad de aplicar estas vacunas en ovinos y caprinos, siendo aspectos necesarios para el control de la DVB en Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Producción Ovina y Caprina en Chile

Las producciones ovina y caprina en Chile, son de importancia por el número de animales que representan, por el número de productores que viven de estos animales y por las praderas que ocupan, que en un gran porcentaje son praderas naturales. Adicionalmente, es importante para el país por las divisas que generan las exportaciones de carne y lana ovina, las que en el año 2010 alcanzaron alrededor de 43,9 millones de dólares (ODEPA, 2011), siendo Europa la principal región de destino de la carne (INE, 2011).

En general, el sector ovino y caprino nacional se ha caracterizado por ocupar suelos donde la producción de ganado bovino es muy difícil (García, 1998), ubicándose en terrenos marginales donde los niveles productivos de los pastizales son bajos, lo que hace que el sistema de crianza sea extensivo con una baja carga animal por unidad de superficie, lográndose bajos índices reproductivos y productivos, lo que se traduce, generalmente, en una baja rentabilidad. La producción ovina en Chile se concentra principalmente en la Región de Magallanes y de la Antártica Chilena donde se encuentra aproximadamente el 56,7% de la masa total de ovinos del país (2.205.270 cabezas según el VII Censo Agropecuario y Forestal del Año de 2007). La producción caprina se concentra mayoritariamente en la Región de Coquimbo donde se encuentra el 57,3% de la masa total de caprinos del país (404.562 cabezas al VII Censo Agropecuario y Forestal del Año de 2007) (INE, 2007) (Cuadro N° 1).

Respecto a las razas ovinas presentes en Chile, se puede afirmar que las mayores existencias corresponden a animales doble propósito (productores de lana y carne) como Corriedale que estaría en un porcentaje de 63,4%, Hampshire en un 10%, Romney Marsh en un 9,7%, Suffolk en un 8,8%, Merino Precoz en un 5,3%, Merino Australiano en un 1,8% y otras razas que estarían en un 1% (García, 1998). En los últimos años, se ha buscado diversificar la producción ovina nacional con la importación de razas especializadas en producción de leche como las Latxa, Milchschaaf y Assaf y también razas especializadas en la producción de carne como Texel (Pérez, 2005). En el caso de los caprinos la situación es algo

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

Cuadro N° 1.

Existencia de ovinos y caprinos según regiones de Chile

Región	Cabezas de caprinos	%	Cabezas de ovinos	%
Total país	705.800		3.889.319	
Región de Tarapacá	2.327	0,3%	10.104	0,3%
Región de Antofagasta	6.181	0,9%	10.588	0,3%
Región de Atacama	39.187	5,6%	5.232	0,1%
Región de Coquimbo	404.562	57,3%	84.215	2,2%
Región de Valparaíso	45.588	6,5%	30.485	0,8%
Región del Libertador General Bernardo O'Higgins	18.573	2,6%	157.648	4,1%
Región del Maule	40.122	5,7%	155.129	4,0%
Región del Biobío	47.319	6,7%	173.735	4,5%
Región de La Araucanía	50.810	7,2%	277.884	7,1%
Región de Los Lagos	11.140	1,6%	315.198	8,1%
Región de Aisén del General Carlos Ibáñez del Campo	12.138	1,7%	304.936	7,8%
Región de Magallanes y de la Antártica Chilena	158	0,0%	2.205.270	56,7%
Región Metropolitana de Santiago	12.325	1,7%	24.517	0,6%
Región de Los Ríos	9.328	1,3%	116.149	3,0%
Región de Arica y Parinacota	6.042	0,9%	18.229	0,5%

Fuente: INE, 2007

Las proyecciones del mercado ovino indican que tanto en el corto como en el mediano plazo existirá una demanda mundial insatisfecha de productos cárnicos ovinos, situación que se refleja en indicadores internacionales principalmente generados en países con mayor nivel de información de la industria, como Australia y Nueva Zelanda. Chile presenta buenas perspectivas comerciales, pues ha venido desarrollando las inversiones necesarias para hacer frente a esta demanda, lo que se espera que se vea reflejado en los indicadores productivos a futuro (ODEPA, 2009).

Virus Diarrea Viral Bovina

Descubrimiento y clasificación

La primera observación descrita de DVB ocurrió en 1946 cuando una nueva enfermedad transmisible fue observada en el estado de Nueva York en Estados Unidos (Olafson *et al.*, 1946). Esta enfermedad se caracterizaba por presentar leucopenia, pirexia, depresión, diarrea, anorexia, erosión gastrointestinal y hemorragias. El agente viral causal fue aislado en 1957 y fue llamado VDVB (Lee y Gillespie, 1957). Una enfermedad similar pero más severa, llamada enfermedad X, fue reportada años después en Canadá. Aunque similar a la DVB, la enfermedad X tendía a afectar a menos animales por rebaño, pero tenía una mayor tasa de letalidad. A diferencia de la DVB, la enfermedad X, después llamada Enfermedad de las Mucosas (EM), no pudo ser transmitida experimentalmente (Ramsey y Chivers, 1953).

A través de la prueba de neutralización se demostró que los agentes virales aislados de la DVB y de la EM en casos encontrados en América del Norte, Alemania y Reino Unido, eran los mismos (Gillespie *et al.*, 1961). Subsecuentemente, fue demostrado que el VDVB estaba antigénicamente relacionado con el entonces denominado "hog cholera virus", posteriormente llamado Virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC) (Darbyshire, 1962). Una década después, por análisis serológicos, se detectó relaciones antigénicas entre el VDVB, el VPPC, y el VEF de los ovinos (Plant *et al.*, 1973).

Descripción del virus

El VDVB, el VPPC, y el VEF, son especies virales que taxonómicamente pertenecen al género *Pestivirus* ubicado en la familia *Flaviviridae*. Son virus esféricos, de 40 a 50 nm de diámetro. La partícula viral está constituida por una envoltura de lípidos que rodea la cápside, la cual contiene el genoma viral. El genoma es RNA de una hebra de sentido positivo de aproximadamente 12,3 kilobases, que contiene regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' y un marco de lectura abierta. Contiene aproximadamente 4.000 codones que codifican para una poliproteína. La poliproteína posterior a la traducción es procesada en 12 polipéptidos en el siguiente orden: N^{P10} es una autoproteasa que fracciona el polipéptido viral en proteínas

individuales, también tiene función de suprimir la respuesta inmune innata previniendo la producción de interferón tipo 1; C forma la nucleocápside del virión; E^{ms}, E1 y E2 son glicoproteínas que integran la envoltura, E^{ms} posee actividad de ribonucleasa y se asocia con la virulencia ya que en su forma soluble suprime la inducción de interferón β y posee epítomos neutralizables menores; E1 es pobre inductora de anticuerpos neutralizantes y se encuentra covalentemente unida a E2; E2 es la proteína mayoritaria, es la más variable y posee epítomos neutralizables dominantes; P7 no está definida su función, y se desconoce si es estructural o no estructural. Las proteínas NS2 y NS3 son altamente conservadas y tienen función de RNA-helicasa y serín-proteasa, NS4A es cofactor de serín-proteasa, NS4B y NS5A son componentes de la replicasa y NS5B es la RNA-polimerasa RNA dependiente (Ridpath, 2010).

Clasificación en biotipos, genotipos, subgrupos genómicos y grupos antigénicos

Biotipos

Pueden diferenciarse dos biotipos, en base a la capacidad de destrucción de células cultivadas *in vitro*, uno citopático (CP) y uno no citopático (NCP), siendo los NCP predominantes en la naturaleza. Los virus CP son escasos y generalmente se encuentran asociados con brotes de EM, una enfermedad altamente letal. Se describe que virus CP surgen de virus NCP a través de eventos mutacionales que llevan a la separación de la proteína viral NS2-3 del virus NCP, a las proteínas NS2 y NS3 del virus CP. La mutación más frecuente resulta de una recombinación en que pequeños trozos de genoma (originados de otro virus VDVB o de la célula infectada) se insertan en el genoma de la cepa NCP. La citopatogenicidad no es signo de virulencia *in vivo*, ya que las enfermedades más severas se asocian mayoritariamente con virus NCP (Ridpath, 2010).

Genotipos y subgrupos genómicos

El análisis de regiones definidas del genoma del VDVB, como 5'UTR, N^{pro}, NS2-3 y E2, reveló la existencia de variantes genéticas que pueden agruparse en genotipos y subgrupos, en base a la similitud de sus secuencias nucleotídicas (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Becher *et al.*, 1999; Vilček *et al.*, 2001). Los genotipos presentan una similitud de

secuencia de cerca del 60%, los subgrupos de 80 a 85%, y los virus que se ubican dentro de un subgrupo presentan homología cercana a un 90% (Bolin y Grooms, 2004). El análisis de la región 5'UTR, que es la región del genoma más conservada, se ha usado mayoritariamente para definir genotipos de pestivirus (Vilček *et al.*, 1994) en tanto que N^{pro} y E2 parecen ser mejores para distinguir diferentes subgrupos (Becher *et al.*, 2003).

Se reconocen dos grupos genéticos o genotipos, el VDVB-1 y el VDVB-2 que se consideran como dos especies diferentes dentro del género *Pestivirus* (Thiel *et al.*, 2005), que se suman a las especies VEF y VPPC. El VDVB-1 y el VDVB-2 están asociados mayoritariamente con enfermedades clínicas moderadas, pero en ocasiones provocan enfermedades clínicas severas como el síndrome hemorrágico producido por VDVB-2 (Corapi *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). Se ha propuesto incluir especies o genotipos adicionales como un VDVB-3 que tiene alta habilidad para generar infecciones persistentes (Liu *et al.*, 2009), un virus jirafa (Harasawa *et al.*, 2000), un aislado obtenido de suero fetal bovino originario de Brasil (Schirrmeyer *et al.*, 2004) que fue relacionado filogenéticamente a un aislado de búfalo y de animales PI con infección persistente (Ståhl *et al.*, 2007), pero estas propuestas aún no han sido aceptadas por el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Ridpath *et al.*, 2010).

Dentro de cada genotipo se describen subgrupos. Se reconocen 15 subgrupos genómicos o también llamados subgenotipos para el 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, VDVB-1m, VDVB-1n, VDVB-1o) (Vilček *et al.*, 2001; Fulton *et al.*, 2002; Hurtado *et al.*, 2003; Toplak *et al.*, 2004; Vilček y Nettleton, 2006; Nagai *et al.*, 2008) y dos para el VDVB-2 (VDVB-2a, VDVB-2b) (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Becher *et al.*, 1999; Giangaspero y Harasawa, 2004).

Tanto genotipos como subgrupos presentan distribuciones geográficas que parecieran dar cuenta de las rutas de movimiento de los animales (Bolin y Grooms, 2004), pero la predominancia de un subgrupo filogenético en algún área es dinámica, ya que en Estados Unidos entre los años 1994 y 2001 los porcentajes de prevalencia de VDVB-1a, VDVB-1b y VDVB-2a fueron de 21%, 43% y 36% respectivamente, y estudios de aislados recuperados

después del año 2001 señalan un porcentaje decreciente para VDVB-1a y VDVB-2a, con un aumento de 75% a 100% de las muestras de VDVB-1b (Ridpath *et al.*, 2011).

Diferentes genotipos y subgrupos de VDVB han sido descritos en rumiantes de distintos países, como ejemplo en Portugal VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1d, VDVB-1e, y VDVB-2 (Barros *et al.*, 2006); en España VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1c, VDVB-1e y VDVB-1h (Vilček *et al.*, 2001; Arias *et al.*, 2003; Hurtado *et al.*, 2003); en Francia VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1d, VDVB-1e, VDVB-1l y VDVB-2a (Jackova *et al.*, 2008); en Suiza, VDVB-1b, VDVB-1e, VDVB-1h y VDVB-1k (Bachofen *et al.*, 2008); en Eslovenia VDVB-1b, VDVB-1d, VDVB-1f y VDVB-1g (Toplak *et al.*, 2004); en Turquía VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1d, VDVB-1f, VDVB-1h, VDVB-1l y VDVB-2 (Yeşilbağ *et al.*, 2008); en Japón VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1c, VDVB-1j, VDVB-1n, VDVB-1o y VDVB-2a (Tajima, 2004; Nagai *et al.*, 2008); en Corea VDVB-1b y VDVB-2 (Kim *et al.*, 2006); en Australia VDVB-1a y VDVB-1c (Ridpath *et al.*, 2010); en Argentina VDVB-1a y VDVB-2 (Juliá *et al.*, 2009) y en Chile VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1i, VDVB-1j, VDVB-2a (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006; Beamín, 2009; Donoso, 2009).

Grupos antigénicos

La baja homología de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la proteína E2, responsable de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, condiciona una gran diversidad antigénica en las poblaciones de VDVB (Couvreur *et al.*, 2002; van Rijn, 2007).

Para caracterizar antigénicamente los aislados virales, se han utilizando distintas técnicas serológicas que permiten determinar diferencias en la reactividad entre ellos, pudiendo ser demostrada la existencia de dos grupos antigénicos que se correlacionan perfectamente con los genotipos VDVB-1 y VDVB-2, para ello se han empleado anticuerpos monoclonales (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Wakeley *et al.*, 2004), pruebas de neutralización con sueros policlonales (Bolin y Ridpath, 1998; Fulton *et al.*, 2003; Couvreur *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2005) y pruebas de respuesta inmune a vacunas (Paton *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 2003). Sin embargo, no hay consenso respecto de si aislados virales pertenecientes a diferentes subgrupos genómicos se correlacionan con las diferencias

antigénicas. Si bien existe el antecedente que es posible diferenciar antigénicamente aislados virales del subgrupo VDVB-1a de aislados virales del VDVB-1b mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Bolin y Ridpath, 1998), Dekker *et al.* (1995) recomiendan la aplicación de pruebas de neutralización cruzada, enfrentando parejas de aislados virales de forma bidireccional, para determinar correctamente las diferencias antigénicas entre ellos, ya que los resultados obtenidos con anticuerpos monoclonales dependen en gran medida de la composición de la batería de anticuerpos monoclonales utilizada, incluyendo el número de anticuerpos, la estabilidad de los epítomos que reconocen y las características antigénicas de los aislados utilizados para producir dichos anticuerpos, siendo necesaria la inclusión de anticuerpos específicos para las variantes antigénicas existentes. Además, las pruebas de neutralización tienen la ventaja de diferenciar, dentro de la población de anticuerpos generados frente a un virus, a aquellos que tienen la capacidad de neutralizar su infectividad, característica que permitiría seleccionar en mejor forma las cepas vacunales que se deben utilizar, a fin de obtener resultados más exitosos en los procesos de inmunización. Mediante la aplicación de pruebas de neutralización cruzada en aislados virales pertenecientes a diferentes subgrupos genómicos, se han encontrado tanto diferencias como similitudes antigénicas entre virus pertenecientes a los distintos subgrupos genómicos (Nagai *et al.*, 2001; Couvreur *et al.*, 2002; Fulton *et al.*, 2003; Pizarro-Lucero *et al.*, 2006). Para conocer si existen diferencias antigénicas significativas entre dos aislados virales, algunas investigaciones utilizan el coeficiente de similitud antigénica (R) (Archetti y Horsfall, 1950), que considera las reactividades relativas de las reacciones homólogas y heterólogas entre dos virus y sus anticuerpos. El coeficiente R entrega un valor de entre 1 y 100 que permite establecer el grado de parentesco antigénico entre dos aislados virales. Valores menores o iguales a 25, representan diferencias mayores o iguales a cuatro veces en los títulos neutralizantes entre los sueros homólogos y heterólogos, considerándose que las diferencias antigénicas son significativas, mientras que valores mayores a 25 demuestran que hay similitud antigénica, lo que quiere decir que, aunque habiendo diferencias antigénicas, estas no son significativas (Hubálek, 1982). La aplicación del coeficiente de similitud antigénica ha corroborado resultados aportados con el empleo de anticuerpos monoclonales, demostrando que hay diferencias antigénicas significativas entre especies de pestivirus (Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Becher *et al.*, 2003; Thabti *et al.*, 2005; Ridpath *et al.*, 2010), entre genotipos del VDVB

(Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Becher *et al.*, 2003; Bachofen *et al.*, 2008; Ridpath *et al.*, 2010; Behera *et al.*, 2011) y ha detectado tanto diferencias como similitudes antigénicas entre subgrupos pertenecientes a un mismo genotipo (Botton *et al.*, 1998; Becher *et al.*, 2003; Bachofen *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2008; Ridpath *et al.*, 2010; Behera *et al.*, 2011).

Infección de Especies Animales con Pestivirus

Históricamente, los pestivirus fueron denominados dependiendo del hospedero animal de donde se aislaban. Sin embargo, hoy se sabe que hay transmisión entre especies, lo que ha sido demostrado en forma natural y experimental (Paton *et al.*, 1995b; Paton *et al.*, 1997). Por ejemplo, el VDVB además de infectar al bovino también infecta a ovinos (Carlsson, 1991; Becher *et al.*, 1995; Pratelli *et al.*, 2001), caprinos (Løken *et al.*, 1982; Carlsson, 1991; Pratelli *et al.*, 2001; Lamm *et al.*, 2009), porcinos (Wensvoort y Terpstra, 1988; Liess y Moennig, 1990), alpacas, llamas (Wentz *et al.*, 2003; Evermann, 2006; Celedón *et al.*, 2006; Mattson *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009), especies silvestres incluyendo ciervos (Becher *et al.*, 1999), búfalos (Stalder *et al.*, 2005), antílopes (Vilček *et al.*, 2005), rebecos (Arnal *et al.*, 2004), pudú (Pizarro-Lucero *et al.*, 2005), caribús (Avalos-Ramirez *et al.*, 2001) y jirafas (Becher *et al.*, 1997; Harasawa *et al.*, 2000). El VEF infecta a ovinos, caprinos, y ocasionalmente se ha aislado de bovinos (Snowdon, 1973; Becher *et al.*, 1999; Hornberg *et al.*, 2009; Strong *et al.*, 2010) y de porcinos (Roehe *et al.*, 1992; Vilček y Belák, 1996). El VPPC sólo se ha aislado de porcinos domésticos y silvestres (Loan y Storm, 1968; Strong *et al.*, 2010).

Efectos de la Infección por Pestivirus en Bovinos, Ovinos y Caprinos

La infección con VDVB, en el bovino, produce diversas manifestaciones clínicas dependiendo de múltiples factores como la edad, estado inmunológico, etapa de preñez en la hembra, edad de gestación del feto al tiempo de la infección, nivel de estrés al momento de la infección, infecciones concurrentes con otros patógenos, virulencia del virus, biotipo del virus y diversidad antigénica. Los virus NCP tienen capacidad para infectar al feto provocando aborto, defectos congénitos o el desarrollo de inmunotolerancia y subsecuente infección

persistente, capacidad que no se produce con virus CP (Bolin y Grooms, 2004). El virus tiene afinidad por las células involucradas en el sistema inmune generando inmunodepresión. La mayoría de los aislados de VDVB-1 y VDVB-2 son de baja virulencia y producen enfermedad subclínica o leve (Ridpath y Neill, 2000). La presentación subclínica se asocia con fiebre moderada, leucopenia y desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Se estima que entre el 70% a 90% de las infecciones son subclínicas (Ames, 1986). La presentación clínica de la DVB consiste en letargia, anorexia, fiebre, diarrea y disminución de la producción de leche en vacas en lactancia. Al final de la década de 1980, en Estados Unidos se produjo una enfermedad por VDVB, denominada “síndrome hemorrágico”, caracterizada por presentar trombocitopenia severa, diarrea hemorrágica, epistaxis, hemorragias en las superficies mucosas, sangramiento en los sitios de inyección, hemorragia en la cámara anterior del ojo, fiebre, leucopenia y muerte (Corapi *et al.*, 1990). Al comienzo de la década de 1990, en Canadá aparece otra forma atípica de infección por VDVB, denominada “infección severa”, que cursó en forma sobreaguda con fiebre, neumonía y muerte repentina en animales de todas las edades, llegando a producir hasta un 25% de muertes en terneros (Carman *et al.*, 1998). Los virus aislados en las dos formas virulentas fueron genotipificados como VDVB-2 (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). En ocasiones, también se han presentado brotes de enfermedad severa en que se ha aislado VDVB-1 con signos como diarrea, deshidratación rápida y muerte (Vilček *et al.*, 2001). En período reproductivo las consecuencias de la infección por el VDVB se asocian con infertilidad, muerte embrionaria, defectos congénitos, abortos e infección fetal. Lo más importante es la infección del feto entre los 30 y 125 días de gestación que puede producir el desarrollo de inmunotolerancia al virus y el subsecuente nacimiento de un ternero PI con VDVB NCP. Un bovino PI con VDVB sirve como reservorio y fuente de transmisión de virus dentro y entre rebaños (Bolin y Grooms, 2004) y además es susceptible de sufrir la EM, enfermedad que se produce únicamente en animales PI con VDVB NCP de cualquier genotipo que se reinfectan con una cepa VDVB CP. La EM es de presentación esporádica, de baja morbilidad y letalidad cercana al 100%. Cursa con signos clínicos de fiebre, anorexia, letargia, diarrea sanguinolenta abundante, deshidratación, descarga nasal muco purulenta y la lesión consiste en úlceras extensivas en la mucosa del tubo digestivo. La muerte se produce alrededor de dos semanas de iniciados los signos clínicos (Thiel *et al.*, 1996).

La infección por pestivirus en ovinos se describe desde el año 1959 cuando, por primera vez, se presentó en la región de la frontera entre Inglaterra y Gales una enfermedad neurológica en corderos recién nacidos caracterizada por tremor y un anormal crecimiento del vellón (Hughes *et al.*, 1959). El aislado viral se llamó VEF. Posteriormente, la enfermedad de la frontera (EF) fue descrita en Europa, Nueva Zelanda, Australia y América del Norte (Hussin y Woldehiwet, 1994). Análisis filogenéticos de aislados virales obtenidos de ovinos y caprinos de diferentes países han permitido segregar el VEF en al menos siete grupos genómicos: el VEF-1 detectado en ovinos de Estados Unidos (Sullivan *et al.*, 1997), el Reino Unido (Vilček *et al.*, 1997), Australia (Becher *et al.*, 1994) y Nueva Zelanda (Vilček *et al.*, 1998); el VEF-2 en rumiantes de Alemania (Becher *et al.*, 2003); el VEF-3 en Suiza (Stalder *et al.*, 2005), Austria (Krametter-Froetscher *et al.*, 2007) y Francia (Dubois *et al.*, 2008); el VEF-4 en España (Arnal *et al.*, 2004); el VEF-5 y VEF-6 en Francia (Dubois *et al.*, 2008); y el VEF-7 en Italia (Giammarioli *et al.*, 2011). En Túnez se detectó un nuevo subgrupo de VEF constituido por aislados de Túnez (Thabti *et al.*, 2005). Todos estos grupos genómicos se llaman VEF verdaderos, para diferenciarlos de los VEF “like” que corresponden a aislados obtenidos de ovinos y caprinos tanto sanos como con EF, y que han sido identificados mediante análisis genómico como VDVB-1 y VDVB-2 (Scherer *et al.*, 2001; Giangaspero y Harasawa, 2004; Kim *et al.*, 2006; Juliá *et al.*, 2009; Krametter-Froetscher *et al.*, 2010).

Enfermedad de la Frontera

La EF puede ser producida por VEF, VDVB-1 y VDVB-2 (Carlsson, 1991; Vilček *et al.*, 1997; Pratelli *et al.*, 2001; Giangaspero y Harasawa, 2004). Sus hospedadores naturales son los ovinos (Nettleton, 1990; Pratelli *et al.*, 2001) y secundariamente los caprinos (Løken *et al.*, 1982; Pratelli *et al.*, 2001). Es una enfermedad neurológica de los corderos recién nacidos caracterizada por presentar desde un tremor continuo a contracciones tónico clónicas de los músculos esqueléticos de todo el cuerpo y la cabeza; tienen movimientos descoordinados, marcha irregular y postura anormal; el vellón presenta un crecimiento anormal que se caracteriza por la presencia de pelos largos ubicados alrededor del cuello y espalda. Los corderos pueden presentar defectos teratogénicos y menor peso, muriendo la mayoría durante las primeras semanas de vida; los sobrevivientes tienen un escaso crecimiento y son más

susceptibles a otras enfermedades, especialmente parásitos gastrointestinales, pulmonares y otras infecciones (Pratelli *et al.*, 2001; Giammarioli *et al.*, 2011). Gradualmente pierden los temores del cuerpo y las anormalidades del vellón (Hussin y Woldehiwet, 1994). En infecciones durante la primera etapa de gestación se puede producir muerte embrionaria y aborto con pérdidas que pueden llegar a un 40%, que sumado a la pobre ganancia de peso de los corderos y cabritos infectados, hace que se generen considerables pérdidas económicas en la crianza de ovinos y caprinos (Arnal *et al.*, 2004; Thabti *et al.*, 2005; Valdazo-González *et al.*, 2006; Marco *et al.*, 2008; Giammarioli *et al.*, 2011). La infección congénita, al igual que en el bovino, puede dar nacimiento de animales PI con viremia de por vida y excreción de virus por vía respiratoria, digestiva y tracto urinario. La mayoría de estos animales no muestran signos clínicos, pero son muy importantes en la epidemiología de la enfermedad siendo fuente de infección para otros animales domésticos y silvestres (Carlsson y Belák, 1994; Paton *et al.*, 1995b; Paton *et al.*, 1997; Krametter-Froetscher *et al.*, 2010) y pueden hacer una enfermedad similar a la EM del bovino (Barlow *et al.*, 1983), caracterizada por diarrea persistente y alteración respiratoria, pero las lesiones histopatológicas, a diferencia del bovino, se centran en lesiones inflamatorias linfoproliferativas en el sistema nervioso central, tracto intestinal, pulmones, corazón y riñón. Cuando la infección fetal ocurre en el último estado de gestación, los corderos son capaces de montar una respuesta inmune específica al virus, caracterizada por una seroconversión dentro de tres semanas. Los corderos infectados después del nacimiento sufren una enfermedad moderada o subclínica. En las ovejas preñadas los signos detectables son un bajo grado de pirexia, una leucopenia de corta duración y una leve descarga vaginal posterior al aborto. En ovejas inmunocompetentes, infectadas experimentalmente, se produce una linfopenia pasajera, y los anticuerpos seroneutralizantes se detectan tres a cinco semanas posterior a la infección y persisten por períodos de 8 a 16 meses (Hussin y Woldehiwet, 1994).

En caprinos se ha demostrado por análisis serológico que la infección por pestivirus está ampliamente diseminada (Løken, 1995; Krametter-Froetscher *et al.*, 2006), sin embargo, la presentación de la enfermedad clínica es escasa y se caracteriza mayormente por afectar a hembras preñadas produciendo placentitis severa, abortos, baja viabilidad de los cabritos recién nacidos y malformaciones en fetos y neonatos (Løken *et al.*, 1982; Becher *et al.*, 1997;

Nettleton *et al.*, 1998; Pratelli *et al.*, 1999; Pratelli *et al.*, 2001; De Mia *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). En el año 1999, en un rebaño de 1.700 caprinos se vieron afectados 600 cabezas con VDVB-1b presentando diarrea severa, ataxia, caquexia, muerte perinatal, alta tasa de abortos, y muerte de 500 animales (Kim *et al.*, 2006). Se describen sólo algunos casos de caprinos PI (Hurtado *et al.*, 2004), lo que lleva a pensar que los ovinos y particularmente los bovinos son el mayor reservorio de pestivirus para los caprinos (Løken, 1995).

Control de Infecciones Producidas por Virus Diarrea Viral Bovina

Considerando las pérdidas productivas y reproductivas que ocasiona la infección con VDVB en el ganado bovino, en el año 2007 la Oficina Internacional de Epizootias agregó el VDVB a la lista de enfermedades del bovino reportables, pero sin considerar las infecciones por el mismo virus en otras especies, en especial ovinos y caprinos, que pueden comportarse como reservorio del virus para el bovino.

Se sostiene que la principal medida para controlar la infección por el VDVB consiste en identificar y retirar los animales PI del rebaño, debido a que son la mayor fuente de contagio, por la elevada y permanente eliminación de partículas virales a través de todas sus secreciones y excreciones (Ridpath, 2010). Este es un proceso complejo porque los animales PI, en la mayoría de las veces, no exteriorizan esta condición, requiriéndose del diagnóstico de laboratorio para detectar viremia y ausencia de respuesta inmune sostenida en el tiempo. Otra medida de control consiste en aplicar vacunas con el fin de evitar la infección del feto y la pérdida del ternero, o el nacimiento de un animal PI. Al respecto, el mercado dispone de vacunas modificadas y vacunas inactivadas, la mayoría son monovalentes y contienen cepas de referencia del VDVB-1a, un número reducido son bivalentes conteniendo VDVB-1a y VDVB-2a y solo se describe una que contiene VDVB-1b. La inmunidad conferida por anticuerpos neutralizantes es efectiva sólo cuando la diferencia en los epítopes neutralizables de la glicoproteína E2, entre la cepa de vacuna y el virus de campo, es mínima. Las mayores diferencias antigénicas se presentan entre aislados de VDVB-1 y VDVB-2 con resultados de cero o cercanos a cero en su capacidad de neutralización (Pellerin *et al.*, 1994; Paton *et al.*, 1999; Fulton y Burge, 2000; Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Becher *et al.*, 2003; DesCôteaux *et*

al., 2003; Patel *et al.*, 2005), de tal modo que la aplicación de vacunas sería efectiva cuando la cepa de la vacuna presenta alta homogeneidad antigénica con el virus de campo. Es posible que la inmunidad alcanzada impida la presentación clínica de la enfermedad, pero no evita la viremia y por consiguiente, no previenen la infección del feto dándose la posibilidad de generar animales PI, que no permiten eliminar el virus de las poblaciones. Además, los diseños de los programas de vacunación deben considerar situaciones de estrés, edad, estado de preñez y periodos de mayor vulnerabilidad a la infección (Ridpath, 2010).

Situación de la Infección por Virus Diarrea Viral Bovina en Chile

Después de sospechar de la presencia del VDVB en el país, el primer aislamiento se produjo el año 1985 cuando se presentó un brote de EM en el sur del Chile (Reinhardt *et al.*, 1986). Posteriormente, el virus se ha aislado de animales sanos, enfermos, fetos abortados (Celedón *et al.*, 1997a), bovinos PI (Celedón *et al.*, 1998), ovinos, caprinos (Müller, 2003), camélidos sudamericanos (Celedón *et al.*, 2006) y de un pudú (Pizarro-Lucero *et al.*, 2005). Estudios serológicos detectaron prevalencias de un 69% en bovinos de la Región de la Araucanía y Región de Los Lagos (Reinhardt *et al.*, 1990) y de 60% en bovinos de leche y 86% en bovinos de carne de la Región Metropolitana (Celedón *et al.*, 1996; Celedón *et al.*, 1997b). Pesquisas serológicas han demostrado en ovinos un 19% (60 de 321) de positivos procedentes de la Región Metropolitana y de la Región de Magallanes y de la Antártica Chilena (Celedón *et al.*, 2001). En caprinos se detectó seropositividad de 6,5% (21 de 322 positivos) de muestras procedentes de la Región de Coquimbo y de la Región Metropolitana (Celedón *et al.*, 2001). En camélidos sudamericanos, ubicados en diferentes lugares de la Región Metropolitana, la seropositividad fue de un 11% (8 de 74 alpacas) y un 14% (6 de 43 llamas) (Celedón *et al.*, 2001).

Los análisis filogenéticos de aislados obtenidos de diferentes especies animales, demuestran que los bovinos se infectan con los subgrupos VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1i, VDVB-1j y VDVB-2a, según la nomenclatura de la región 5'UTR (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006; Donoso, 2009). Por otra parte, en ovinos y caprinos los aislados han correspondido a subgrupo VDVB-1e y en camélidos sudamericanos los aislados se han identificado como

subgrupo VDVB-1b, VDVB-1e y VDVB-2a, según la nomenclatura del análisis de la región E2 (Beamín, 2009). Cabe destacar que los aislados identificados como VDVB-1e por análisis del segmento E2 corresponden al subgrupo VDVB-1j en el análisis del segmento 5'UTR (Vilček *et al.*, 2001; Aguirre, 2009; Beamín, 2009). Los aislados se han obtenido de animales sanos y de animales enfermos desconociéndose el rol patógeno y el grado de inmunidad cruzada entre aislados de diferentes genotipos y subgrupos obtenidos de las especies animales mencionadas.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Existen diferencias antigénicas entre aislados de VDVB-1j obtenidos de ovinos y caprinos, con VDVB-1b y VDVB-1j obtenidos de bovinos, VDVB-2a obtenido de camélidos sudamericanos y VDVB-1a de cepas de referencia.

OBJETIVO GENERAL

Conocer el comportamiento antigénico de aislados de VDVB obtenidos de ovinos y caprinos en relación a aislados y cepas de referencia de VDVB de diferentes genotipos y subgrupos obtenidas de bovinos y de camélidos sudamericanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Producir reservas de VDVB-1j aislados de ovinos y caprinos, de VDVB-1b y VDVB-1j aislados de bovinos, de VDVB-2a aislados de camélidos sudamericanos y de VDVB-1a aislados de bovinos.

Elaborar, en conejos, sueros hiperinmunes contra VDVB-1j aislados de ovinos y caprinos, VDVB-1b y VDVB-1j aislados de bovinos, VDVB-2a aislados de camélidos sudamericanos y VDVB-1a aislados de bovinos.

Establecer si existen diferencias antigénicas entre VDVB-1j aislados de ovinos y caprinos, con VDVB-1b y VDVB-1j aislados de bovinos, VDVB-2a aislados de camélidos sudamericanos y con VDVB-1a aislados de bovinos y usados como cepas de referencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se utilizaron cepas de referencia y aislados de VDVB obtenidos de bovinos, ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos, genómicamente identificados en su genotipo y subgrupo. Las muestras se encontraban congeladas a -80° C en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Cuadro N° 2, Figura N° 1).

Producción de Reservas Virales

Los aislados y las cepas de referencia fueron recuperados cultivándolos en monocapas de células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) haciendo los pasajes necesarios para obtener títulos mínimos de 10^5 dosis infectante cultivo de tejido 50% (DICT₅₀) por ml, en cantidades adecuadas, y bajo condiciones de bioseguridad aceptadas (Anexo N° 1). Para ello, se sembraron 800.000 células en una superficie de 40 cm², las que fueron cultivadas en 10 ml de medio esencial mínimo Eagle (GIBCO BRL, Cat. N° 41500-067) adicionado de HEPES (GIBCO BRL, Cat. N° 11344-041), 1 mM de piruvato de sodio (GIBCO BRL Cat. N° 11360-070), 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, 100 UI de penicilina, 100 mg de estreptomicina y 2,5 mg de fungizona por ml de medio de cultivo (MEM) el que adicionado de un 8% de suero equino (obtenido del Instituto de Salud Pública de Chile, inactivado a 56° C por 30 minutos), constituyó el MEM de crecimiento. A las 24 horas de permanecer a temperatura de 37° C, una vez formada la monocapa de células, se retiró el MEM de crecimiento, se inoculó 200 ul de virus, se incubó una hora a 37° C y se agregó 10 ml de MEM adicionado de un 1% de suero equino (MEM de mantención). Los cultivos inoculados se mantuvieron a 37° C con observaciones microscópicas diarias; en los inoculados con virus CP (cepas de referencia NADL, Singer y Oregon), la incubación se mantuvo por 48 a 72 horas hasta producirse alrededor del 90% de destrucción de las células, y en los inoculados con virus NCP, la incubación se mantuvo por 72 horas. Posteriormente, se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación, para lisar las células y liberar el virus de su ubicación

intracelular. El medio de cultivo que contenía partículas virales y lisado de células se centrifugó a 1000 g por 15 minutos a temperatura de 4° C y el sobrenadante se distribuyó en alícuotas de 1 ml que fueron conservadas a -80° C para, posteriormente, cuantificar la infectividad viral.

Cuadro N° 2

Identificación de cepas de referencia y aislados del Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) utilizados en este estudio, designados bajo la nomenclatura de análisis de un segmento de la región no traducida 5'UTR del VDVB

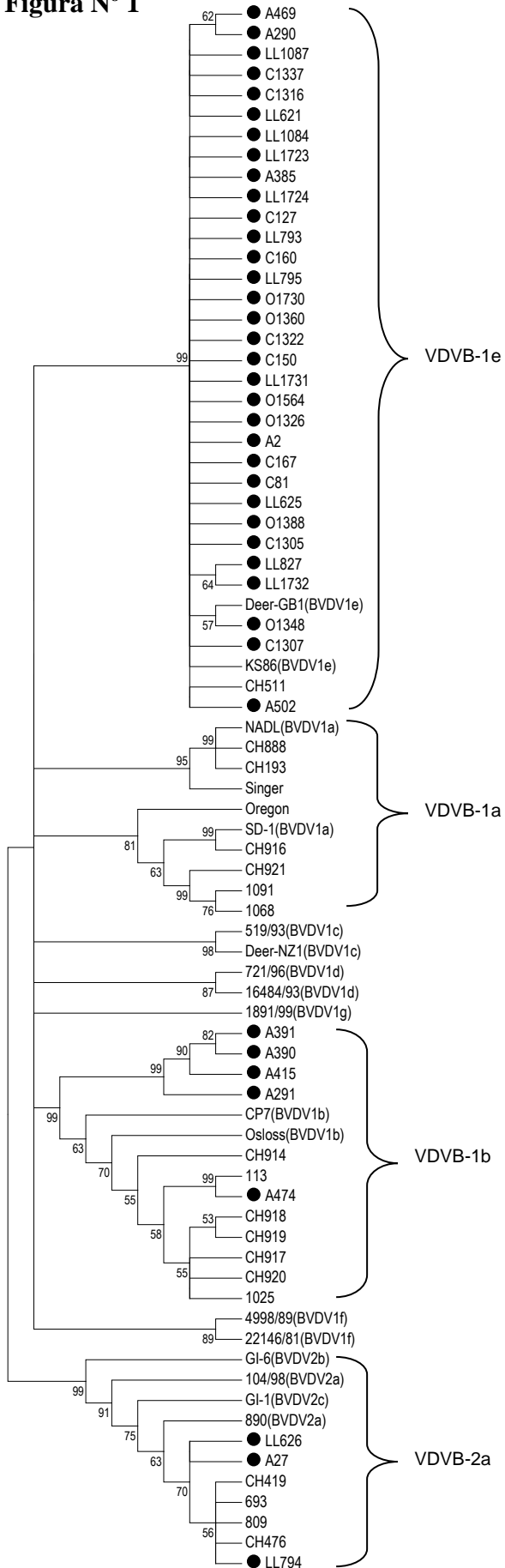
Identificación del virus	Genotipo y subgrupo	Especie de origen	Signos clínicos	Tipo de muestra	Año de aislamiento	Lugar geográfico	Cita bibliográfica
NADL*	VDVB-1a	Bovino	Muerto	Bazo	1963	Estados Unidos	Gutekunst y Malmquist, 1963
Singer*	VDVB-1a	Bovino	SA	SA	SA	Estados Unidos	Deregt, 2005
Oregon*	VDVB-1a	Bovino	SA	SA	1960	Estados Unidos	Gillespie <i>et al.</i> , 1960
CH113	VDVB-1b	Bovino	Infección persistente	Sangre	1995	RM, C. María Pinto	Pizarro–Lucero <i>et al.</i> , 2006
CH1025	VDVB-1b	Bovino	Alteraciones reproductivas	Sangre	2007	RM, C. Melipilla	Donoso, 2009
CH511**	VDVB-1j	Bovino	Feto abortado	Órganos	1993	R. del Libertador Bernardo O'Higgins C. Rancagua	Pizarro–Lucero <i>et al.</i> , 2006
C81***	VDVB-1j	Caprino	Sano	Sangre	1998	RM, C. Til-Til	Beamín, 2009
C127***	VDVB-1j	Caprino	Sano	Sangre	1998	R. de Coquimbo, C. Ovalle	Beamín, 2009
C167***	VDVB-1j	Caprino	Sano	Sangre	1998	R. de Coquimbo, C. Ovalle	Beamín, 2009
C1305***	VDVB-1j	Caprino	Sano	Sangre	2001	RM	Beamín, 2009
O1348***	VDVB-1j	Ovino	Sano	Sangre	2001	RM, C. San José de Maipo	Beamín, 2009
O1388***	VDVB-1j	Ovino	Sano	Sangre	2001	R. de Coquimbo, C. de Ovalle	Beamín, 2009
O1730***	VDVB-1j	Ovino	Sano	Sangre	2002	R. de Magallanes y la Antártica Chilena	Beamín, 2009
A27	VDVB-2a	Alpaca	Sano	Sangre	1998	RM	Beamín, 2009
LL626	VDVB-2a	Llama	Sano	Sangre	1999	RM, C. La Pintana	Beamín, 2009

*Cepa de referencia. **Corresponde a VDVB-1c bajo el análisis realizado por Pizarro–Lucero *et al.*, 2006.

***Corresponde a VDVB-1e bajo el análisis de una fracción del gen de la proteína E2.

SA = Sin antecedente. RM = Región Metropolitana. R. = Región. C. = Comuna

Figura N° 1



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), pertenecientes a cepas de referencia de aislados de VDV. La construcción del árbol incluyó el método Neighbor-Joining, análisis de 2 parámetros de Kimura y análisis de bootstrap de 1000 réplicas (Beamín, 2009).

Cuantificación de la Infectividad Viral

Para conocer los títulos infecciosos, los virus se diluyeron en base 10, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Cada una de las diluciones se sembraron en un volumen de 50 ul por pocillo, empleando, por dilución, cuatro pocillos con monocapas de aproximadamente 10.000 células MDBK cada uno. Se incubó a 37° C por 60 minutos y luego se adicionó 50 ul de MEM de mantención a cada pocillo. Posteriormente, se incubó a 37° C en un ambiente de 5% de CO₂ por un período de 72 horas. Para la titulación de los virus CP, que corresponden a las cepas de referencia, la presencia del virus en los pocillos inoculados se evidenció por la aparición de destrucción celular, y en los NCP la evidencia se obtuvo detectando antígenos virales en las células mediante la prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IPI).

Para la prueba de IPI, las monocapas celulares se lavaron con solución tampón fosfato 0,01M y pH 7,6 (PBS) y se fijaron a la microplaca aplicando 200 ul de acetona concentrada al 20% en PBS, por 30 minutos. Posteriormente, se descartó la acetona, se secaron por un mínimo de cuatro horas bajo el calor de una ampolleta de 40 watts, se lavaron dos veces con PBS adicionado de Tween® 20 y luego se aplicó una mezcla de cuatro anticuerpos monoclonales dirigidos contra pestivirus (Central Veterinary Laboratory Agency IPEX-BVD staining kit Cat. N° PA 0258) y se dejó incubando por 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se repitieron los lavados y luego se adicionó un conjugado de anticuerpos de caprino anti-inmunoglobulina de ratón unido a peroxidasa de rábano picante, (Goat anti-mouse IgG-HRP, Invitrogen Cat. N° D22185) el que se dejó actuar por 60 minutos y posteriormente se repitieron los lavados. Finalmente, se reveló la presencia de antígenos virales mediante la adición del sustrato diaminobencidina que, en presencia de perborato de sodio, generó un color marrón que se observó en el citoplasma de las células infectadas, contrastando con el núcleo sin teñir.

El título viral se calculó a través del método de Reed y Muench (1938), que determina la dilución que presenta antígenos virales en el 50% de los pocillos inoculados, esto fue expresado en el valor recíproco de la dilución, como dosis infectante cultivo de tejido 50%.

En caso que el título viral fuera menor a 10^5 DICT₅₀/ml, se repitió el proceso de inoculación viral en nuevas monocapas de células de 40 cm² y se tituló, nuevamente, la partida de virus cosechado.

Elaboración de Sueros Hiperinmunes

La producción de sueros hiperinmunes policlonales se realizó en conejos de raza Neozelandés de más de 2 kg, obtenidos en el Bioterio del Instituto de Salud Pública de Chile, que fueron mantenidos bajo las condiciones señaladas por Romero y Fuenzalida (1983) (Anexo N° 2). Cada conejo fue inoculado en la vena marginal de la oreja con 1 ml conteniendo 100.000 DICT₅₀ de una de las cepas de referencia o de los aislados virales, en los días 1, 3, 5, 7 y 9. En el día 40 se reinoculó 1 ml del mismo virus por la misma vía y al cabo de 15 días se tomó una muestra de sangre y se midió, por prueba de seroneutralización (detallada más adelante), el nivel de anticuerpos frente al virus que indujo su producción (virus homólogo). Si el suero tenía un título menor a 80 dosis protectivas 50% (DP₅₀), se administró una nueva dosis de virus y posterior a 10 días se tomó la muestra de sangre.

Para obtener el suero hiperinmune se extrajo un volumen aproximado de 200 ml de sangre desde la vena marginal de la oreja, previa sedación del animal con acepromazina (0,04 mg/Kg) y posterior sacrificio por sobredosis de anestesia (ketamina 5 mg/Kg). La sangre extraída se dejó coagular por 24 horas, luego se retiró el suero, se centrifugó a 1.000 g, se descomplementó por calentamiento en baño de agua a 56° C por 30 min y se hicieron alícuotas de 1 ml que se conservaron a -20° C.

Titulación de Sueros Hiperinmunes

Para la titulación de los sueros hiperinmunes se realizó la prueba de seroneutralización (SN) haciendo reaccionar diluciones al doble de los sueros, desde 1:2 hasta 1:2048 con 100 DICT₅₀ del virus homólogo. Las mezclas suero-virus se incubaron a 37° C por una hora y, posteriormente, se sembraron en volúmenes de 100 ul por pocillo, en cuatro pocillos que

habían sido sembrados con 100.000 células 24 horas antes. Después de incubar 60 minutos a 37° C, se agregó medio de cultivo de mantención y se incubó por 72 horas a 37° C en ambiente con 5% de CO₂. En la reacción que incluía las cepas CP la no protección del suero se identificó por la observación de destrucción de la monocapa celular y en los aislados NCP se aplicó la prueba de IPI para detectar la presencia de antígenos virales en las células. El título de SN del suero, que corresponde al valor recíproco de la dilución de suero que impide que el 50% de los cultivos presente antígenos virales, fue calculado por el método de Reed y Muench (1938) y se expresa en dosis protectora 50%.

Determinación de Antigenicidad Cruzada entre los Virus

Para determinar si existen diferencias antigénicas entre los aislados de VDVB-1j obtenidos de ovinos y caprinos, con las cepas y los aislados de VDVB-1a, VDVB-1b y VDVB-1j y VDVB-2a, los sueros se titularon en pruebas de SN cruzadas, en que se hizo reaccionar cada suero hiperinmune con 100 DICT₅₀ de su virus homólogo y con 100 DICT₅₀ de cada uno de los virus heterólogos. Cada reacción se repitió, en diferentes tiempos, un mínimo de tres veces. Con los títulos de SN de las tres mediciones se obtuvo la media geométrica y con este valor se calculó el Coeficiente de Similitud Antigénica “R” entre cada par de aislados (Archetti y Horsfall, 1950).

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

Los valores menores o iguales a 25 representan diferencias en cuatro o más veces los títulos en sus sueros homólogos y heterólogos e indica que existen diferencias antigénicas significativas (Hubálek, 1982). Valores mayores a 25 dan cuenta de similaridad antigénica.

RESULTADOS

En la producción de las reservas virales VDVB, se hicieron entre tres a cinco pasajes en cultivos celulares para obtener títulos sobre 10^5 DICT₅₀ de cada una de las cepas y aislados virales. En la elaboración de sueros hiperinmunes, de 15 conejos inoculados con cada VDVB, en 14 se obtuvieron títulos neutralizantes igual o mayor a 80 DP₅₀. El conejo utilizado con el aislado C127 repitió el protocolo de inoculación por tres veces sin lograr superar el título de 16 DP₅₀, por lo que el suero de este animal se retiró de la experiencia.

Cada uno de los sueros neutralizaron en mejor forma a su virus homólogo (virus que indujo su producción) que a los virus heterólogos. El rango de DP₅₀ en la reacción homóloga del subgrupo VDVB-1a fue de 360 a 770; del subgrupo VDVB-1b fue de 128 y 350; del subgrupo VDVB-1j fue de 128 a 340; y el de VDVB-2a fue de 170 y 80 (Cuadro N° 3).

Cuadro N° 3

Títulos de anticuerpos neutralizantes en reacción de neutralización cruzada de Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) de diferentes subgrupos genómicos obtenidos de cepas de referencia^a y de aislados de bovinos, ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos

Sueros anti	Subgrupos virales													
	VDVB-1a			VDVB-1b		VDVB-1j							VDVB-2a	
	NADL	Singer	Oregon	CH113	CH1025	CH511	O1348	O1388	O1730	C81	C167	C1305	A27	LL626
αNADL	660^b	512	400	125	190	71	30	65	42	59	55	32	16	5
αSinger	160	360	280	30	3	2,5	2,5	5	2,5	3	2,5	2,5	3	5
αOregon	110	180	770	100	24	32	10	32	15	39	12	10	14	8
αCH113	97	180	17	350	80	46	23	64	23	46	46	25	35	50
αCH1025	20	51	10	128	128	6	23	40	32	30	50	36	2,5	5
αCH511	8	5	2	2,5	2,5	128	61	128	84	128	64	73	2,5	<2
αO1348	3	2,5	<2	2,5	2	140	180	180	120	160	112	112	2,5	<2
αO1388	3	12	4,4	3	2	280	65	340	290	210	256	160	2,5	<2
αO1730	2,5	2	4,4	2,5	2	59	46	92	260	240	71	224	2,5	<2
αC81	10	4	4,4	32	14	140	120	40	50	230	80	120	2,5	2,5
αC167	11	4	2	3	3	59	32	60	42	84	128	60	2,5	2,5
αC1305	3	2,5	3,1	2	3	120	77	128	84	160	128	160	2,5	<2
αA27	4	2,5	3,6	4	2,5	<2	<2	2,5	<2	<2	<2	<2	170	160
αLL626	<2	2,5	2,5	<2	2,5	<2	<2	2,5	<2	<2	<2	<2	32	80

^a NADL, Singer y Oregon.

^b DP₅₀ = Valor recíproco de la dilución de suero que neutraliza 100 DICT₅₀.

En negrita reacción de suero con el virus que indujo su producción.

Enmarcadas reacciones suero-virus pertenecientes a un mismo subgrupo genómico.

En las reacciones de neutralización en que se hizo reaccionar sueros con virus pertenecientes a un mismo subgrupo genómico, los sueros producidos contra los aislados de ovinos, caprinos y un bovino, que se ubican en el subgrupo VDVB-1j, en reacción con los virus heterólogos, del mismo subgrupo, mostraron diferencias en sus capacidades neutralizantes que no difirieron en más de dos diluciones en relación a la reacción homóloga. En los subgrupos VDVB-1a, VDVB-1b y VDVB-2a, la situación fue similar (Cuadros N° 4 y N° 5). Lo que estaría demostrando que, para estos aislados, los sueros policlonales producidos contra virus de un subgrupo tienen capacidad para neutralizar a virus heterólogos del mismo subgrupo en igual magnitud o, a lo más, con una diferencia de dos diluciones en sus títulos DP₅₀.

Cuadro N° 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 Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) de diferentes subgrupos genómicos obtenidos de cepas de referencia y de aislados de bovinos, ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos

Sueros anti	Subgrupos virales													
	VDVB-1a			VDVB-1b		VDVB-1j						VDVB-2a		
	NADL	Singer	Oregon	CH113	CH1025	CH511	O1348	O1388	O1730	C81	C167	C1305	A27	LL626
αNADL	660^b	<1 ^c	<1	2	1	3	4	3	3	3	3	4	5	7
αSinger	1	360	<1	3	6	7	7	6	7	6	7	7	6	6
αOregon	2	2	770	2	5	4	6	4	5	4	6	6	5	6
αCH113	1	<1	4	350	2	2	3	2	3	2	2	3	3	2
αCH1025	2	1	3	0	128	4	2	1	2	2	1	1	5	4
αCH511	4	4	6	5	5	128	1	0	<1	0	1	<1	5	7
αO1348	5	6	7	6	6	<1	180	0	<1	<1	<1	<1	6	7
αO1388	6	4	6	6	7	<1	2	340	<1	<1	<1	1	7	8
αO1730	6	7	5	6	7	2	2	1	260	<1	1	<1	6	8
αC81	4	5	5	2	4	<1	<1	2	2	230	1	<1	6	6
αC167	3	5	6	5	5	1	2	1	1	<1	128	1	5	5
αC1305	5	6	5	6	5	<1	1	<1	<1	0	<1	160	6	7
αA27	5	6	5	5	6	7	7	6	7	7	7	7	170	<1
αLL626	6	5	5	6	5	6	6	5	6	6	6	6	1	80

^a NADL, Singer y Oregon.

^b En negrita DP₅₀ de la reacción de suero con el virus que indujo su producción (reacción homóloga).

^c Diferencia en número de diluciones entre el título de las reacciones homólogas y heterólogas.

Enmarcadas reacciones suero-virus pertenecientes a un mismo subgrupo genómico.

En las reacciones de neutralización en que se hizo reaccionar sueros con virus pertenecientes a diferentes subgrupos genómicos, los sueros producidos contra los aislados de los ovinos y caprinos (VDVB-1j), en reacción con los virus de los subgrupos VDVB-1a, VDVB-1b y VDVB-2a, mostraron diferencias en sus capacidades neutralizantes que fluctuaron entre 2 a 8 diluciones (Cuadro N° 4) con promedios de 4,5 a 7 (Cuadro N° 5). Lo anterior estaría demostrando que, los sueros policlonales producidos contra aislados VDVB-1j de ovinos y caprinos, presentan promedios de diferencias por sobre cuatro diluciones en sus títulos DP₅₀ en su capacidad de neutralizar a cepas de VDVB-1a, aislados de bovinos de VDVB-1b y aislados de camélidos VDVB-2a.

Cuadro N° 5

Promedios del 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 Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) de diferentes subgrupos genómicos obtenidos de cepas de referencia^a y de aislados de bovinos, ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos

Sueros anti	Subgrupos virales					
	VDVB-1a bovino	VDVB-1b bovino	VDVB-1j bovino	VDVB-1j ovino	VDVB-1j caprino	VDVB- 2a camélido
VDVB-1a bovino		3,2 ^b	4,7	5,0	5,1	5,8
VDVB-1b bovino	1,8		3	2,2	1,8	3,5
VDVB-1j bovino	4,7	5,0		0,3	0,3	6,0
VDVB-1j ovino	5,8	6,3	0,7		0,2	7,0
VDVB-1j caprino	4,9	4,5	0,3	1		5,8
VDVB-2a camélido	5,3	5,5	6,5	6,2	6,5	

^a NADL, Singer y Oregon.

^b Promedio del número de diluciones de diferencia entre los títulos de las reacciones homólogas y heterólogas.

El coeficiente de similitud antigénica obtenido producto de las reacciones suero-virus homólogas y suero-virus heterólogas, que en valores menores o iguales a 25 indican diferencias antigénicas significativas entre dos virus (Hubálek, 1982), demostró que entre los aislados virales de los ovinos, de los caprinos y del bovino del subgrupo VDVB-1j, no presentaron diferencias antigénicas significativas, ya que el valor mínimo fue de 30 (Cuadro N° 6) que ocurrió entre los aislados O1730 y C167, en tanto que los valores promedio de R para las reacciones entre los aislados de las tres especies fueron de 51, 63 y 64 (Cuadro N° 7). De igual manera, se demostró que las cepas dentro del subgrupo VDVB-1a, los aislados de

bovinos dentro del subgrupo VDVB-1b y los aislados de camélidos dentro del subgrupo VDVB-2a, no presentaron diferencias antigénicas significativas, con valores promedio de R de 44, 48 y 61, respectivamente (Cuadro N° 7).

Cuadro N° 6

Coefficiente de similitud antigénica^a (R) entre Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) pertenecientes a diferentes subgrupos genómicos obtenidos de cepas de referencia^b y de aislados de bovinos, ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos

	Subgrupos virales													
	VDVB-1a			VDVB-1b		VDVB-1j						VDVB-2a		
	NADL	Singer	Oregon	CH113	CH1025	CH511	O1348	O1388	O1730	C81	C167	C1305	A27	LL626
NADL	100	59	29	23	21	8	3	3	2	6	8	3	2	1
Singer		100	43	21	6	2	1	2	1	1	1	1	1	2
Oregon			100	8	5	3	1	2	2	3	2	2	2	2
CH113				100	48	5	3	4	3	14	6	3	5	6
CH1025					100	3	4	4	4	12	10	7	2	3
CH511						100	61	91	39	78	48	65	2	2
O1348							100	44	34	68	39	55	1	2
O1388								100	55	33	59	61	1	1
O1730									100	45	30	67	1	1
C81										100	48	72	1	2
C167											100	61	2	2
C1305												100	1	2
A27													100	61
LL626														100

^a Valores menores o iguales a 25 representan diferencias significativas (Hubálek, 1982).

^b NADL, Singer y Oregon.

Enmarcados virus pertenecientes a un mismo subgrupo genómico.

En negrita corresponde al R de la reacción homóloga.

Los aislados de ovinos y caprinos así como el de bovino, del subgrupo VDVB-1j, en relación con los virus pertenecientes a los otros subgrupos genómicos, mostraron coeficientes de similitud antigénica individuales menores a 25, y como promedios, entre R = 1 y 8 demostrando que existen diferencias antigénicas significativas entre los aislados del subgrupo VDVB-1j con las cepas de VDVB-1a, los aislados de bovinos del subgrupo VDVB-1b y los aislados de camélidos del subgrupo VDVB-2a. Los valores de R entre los virus pertenecientes a los subgrupos VDVB-1a, VDVB-1b y VDVB-2a también mostraron diferencias antigénicas significativas entre ellos (Cuadros N° 6 y N° 7).

Cuadro N° 7

Valores promedio del coeficiente de similitud antigénica de reacciones heterólogas entre Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) pertenecientes a diferentes subgrupos genómicos obtenidos de cepas de referencia y de aislados de bovinos, ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos

	1a bovino	1b bovino	1j bovino	1j ovino	1j caprino	2a camélido
1a bovino	44	14	4	2	3	2
1b bovino		48	4	4	8	4
1j bovino				63	64	1
1j ovino				44	51	1
1j caprino					60	1
2a camélido						61

a NADL, Singer y Oregon.

b Valores menores o iguales a 25 representan diferencias significativas (Hubálek, 1982).

En negrita virus pertenecientes a un mismo subgrupo genómico.

DISCUSIÓN

Aislados virales del género *Pestivirus* obtenidos de diferentes especies animales, se han podido separar en grupos de acuerdo a su parentesco antigénico, los que se correlacionan con genotipos virales, en que se destacan las especies VDVB-1, VDVB-2, VEF y VPPC (Dekker *et al.*, 1995; Paton *et al.*, 1995a; van Rijn *et al.*, 1997). No obstante, no está totalmente definida la relación entre variantes antigénicas y subgrupos genómicos. Bajo este concepto, en esta memoria de título se estudian las similitudes antigénicas (Archetti y Horsfall, 1950) que existen entre aislados chilenos del subgrupo VDVB-1j obtenidos de ovinos y caprinos, con un aislado de bovino del mismo subgrupo, dos aislados de bovinos del subgrupo VDVB-1b, un aislado de alpaca y uno de llama del subgrupo VDVB-2a y las cepas de referencia del subgrupo VDVB-1a (NADL, Singer y Oregon), mediante reacciones de neutralización cruzada con sueros policlonales elaborados en conejos.

Las investigaciones realizadas para conocer diferencias y similitudes antigénicas entre pestivirus, a través de pruebas de seroneutralización, se han efectuado con sueros obtenidos de los animales convalecientes después de una infección natural (Bachofen *et al.*, 2008) y sueros policlonales obtenidos por inoculaciones experimentales en terneros (Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Couvreur *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2008), ovinos (Botton *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2001; Becher *et al.*, 2003; Thabti *et al.*, 2005; Nagai *et al.*, 2008; Behera *et al.*, 2011), caprinos (Nagai *et al.*, 2008; Ridpath *et al.*, 2010), porcinos (Schirrneier *et al.*, 2004) y en ocasiones se han empleado animales de laboratorio como conejos (Schirrneier *et al.*, 2004; Pizarro-Lucero *et al.*, 2006). En todos los casos, independiente de la capacidad de respuesta inmune propia de la especie animal y de la cantidad de DICT₅₀ usadas en cada investigación, se ha obtenido variación de los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a sus virus homólogos. Una situación semejante se presentó en esta investigación ya que en la producción de sueros hiperinmunes, a pesar de haberse administrado una igual cantidad de DICT₅₀ de cada virus, con un mismo patrón de inoculación a conejos de raza, edad, sexo y peso similar, los títulos de anticuerpos neutralizantes no fueron iguales para todos los virus. Los aislados virales obtenidos de ovinos y caprinos generaron títulos de anticuerpos que fluctuaron entre 128 y 340 DP₅₀ (Cuadro N° 3), valores que

estuvieron dentro del rango de respuesta inducida por los aislados virales obtenidos de las otras especies animales, los que fluctuaron entre 80 y 770 DP₅₀ (Cuadro N° 3). La variación de los títulos seroneutralizantes podría atribuirse a una diferente capacidad de respuesta inmune de cada animal, o a diferentes capacidades de los aislados para generar respuesta inmune, lo que estaría apoyado por el hecho de que, en esta experiencia, un conejo no generó un nivel satisfactorio de anticuerpos, a pesar de habersele administrado inoculaciones repetidas y por sobre el patrón de inoculación aplicado al resto de los conejos, lo que impidió incluir este aislado en el estudio.

La comparación de reacciones de neutralización entre pares suero-virus homólogo con suero-virus heterólogo, pertenecientes a un mismo subgrupo genómico, demostró que no hubo diferencias antigénicas significativas entre los aislados obtenidos de ovinos, caprinos y un bovino de subgrupo VDVB-1j. La variación en los títulos neutralizantes a lo más fue de dos diluciones entre pares individuales y el promedio de las diferencias no superaron a una dilución. Las similitudes antigénicas (R) entre estos pares individuales fluctuaron entre 30 y 91 (Cuadro N° 6) y los promedios fueron de 51 entre ovinos y caprinos, 63 entre el bovino y los ovinos, y 64 entre el bovino y los caprinos (Cuadro N° 7). Los resultados fueron semejantes entre las cepas de referencia (NADL, Singer y Oregon) pertenecientes al subgrupo VDVB-1a con un R promedio de 44, entre los aislados de bovinos del subgrupo VDVB-1b con un R de 48 y entre los aislados de camélidos del subgrupo VDVB-2a con un R de 61 (Cuadro N° 7). La ausencia de diferencias antigénicas significativas entre virus pertenecientes a un subgrupo es coincidente con los resultados de otras investigaciones en que se comparan aislados virales pertenecientes a los subgrupos VDVB-1a (Patel *et al.*, 2005), VDVB-1b y VDVB-1f (Couvreur *et al.*, 2002), pero no coincide con un resultado de R de 17,68, que señala diferencias antigénicas significativas entre las cepas NADL y Oregon (subgrupo VDVB-1a) (Botton *et al.*, 1998). Sin embargo, cabe destacar que en esta memoria el menor valor de R entre los virus del subgrupo VDVB-1a se encontró en el par NADL–Oregon (29) (Cuadro N° 6), muy cerca de una diferencia antigénicamente significativa, como lo reportado por Botton *et al.* (1998). No es descartable que la diferencia antigénica detectada entre las dos experiencias podría atribuirse a fluctuaciones en la medición ya que un suero probado en dos ocasiones puede mostrar una variación de dos diluciones (Patel *et al.*, 2005). Para disminuir este error,

en este estudio se trabajó con valores promedios obtenidos de cada una de las reacciones en cuadruplicado, por un mínimo de tres repeticiones.

La comparación de reacciones de neutralización entre pares suero-virus homólogo con suero-virus heterólogos pertenecientes a diferentes subgrupos genómicos, demostró que entre los aislados obtenidos de ovinos, caprinos y un bovino del subgrupo VDVB-1j con el resto de las cepas y los aislados, hubo diferencias promedios de 4,7 a 7 (Cuadro N° 5) diluciones en los títulos neutralizantes y valores de R que fluctuaron entre 1 y 14 (Cuadro N° 6). Las mayores diferencias entre los virus VDVB-1j se obtuvieron con los aislados del subgrupo VDVB-2a, situación similar a la de otras investigaciones que analizan las diferencias y similitudes antigénicas entre los genotipos VDVB-1 y VDVB-2, debido a que los valores de R, aquí obtenidos, estuvieron en la misma magnitud de los encontrados en aislados virales de bovinos (Becher *et al.*, 2003; Bachofen *et al.*, 2008; Ridpath *et al.*, 2010; Behera *et al.*, 2011), de ovinos (Botton *et al.*, 1998; Paton *et al.*, 1999; Mishra *et al.*, 2008), y de caprinos (Mishra *et al.*, 2007). Se suma a estos datos, otros antecedentes en que se estimaron que los dos genotipos fueron antigénicamente diferentes, al detectar diferencias de cuatro o más diluciones en los títulos de anticuerpos neutralizantes entre las reacciones del par suero-virus homólogo de un genotipo con la reacción del mismo suero con el virus del otro genotipo (Nagai *et al.*, 2001; Couvreur *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2005). En este estudio, los sueros producidos para los VDVB-1j aislados de ovinos y caprinos mostraron diferencias de cuatro y más diluciones en sus títulos seroneutralizantes, entre la reacción homóloga y las reacciones producidas con los VDVB-1b aislados de bovinos (excepto en el par suero-virus C81-CH113), y en las reacciones inversas, en que los sueros anti VDVB-1b neutralizaron los virus VDVB-1j, los resultados mostraron diferencias entre una y cuatro diluciones. Bajo este último resultado se podría estimar que no hay diferencias antigénicas significativas entre los dos subgrupos genómicos, sin embargo, a través del cálculo del coeficiente de similitud antigénica se pudo establecer que las diferencias entre los subgrupos fueron significativas en todos los casos.

Los dos antecedentes disponibles que estudian el comportamiento antigénico que incluyen un aislado ubicado filogenéticamente en el subgrupo VDVB-1j, corresponden por un lado a un virus obtenido de un ternero en Japón que, similar a este estudio, presentó

diferencias antigénicas significativas con aislados pertenecientes a los subgrupos VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1c, VDVB-1d, VDVB-1n y VDVB-1o (Nagai *et al.*, 2008); el otro antecedente corresponde a un aislado viral obtenido de un bovino de Chile donde se describe heterogeneidad antigénica al producirse diferencias de cuatro diluciones entre el aislado CH511 y la cepa NADL (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006). Esta baja disponibilidad de antecedentes puede atribuirse a que la participación del subgrupo VDVB-1j, en otros países y en particular en los que se ha estudiado el perfil filogenético de aislados de VDVB, es de baja ocurrencia ya que la información de la distribución geográfica de patrones genómicos de los subgrupos predominantes dan cuenta de VDVB-1a en el Reino Unido (Vilček *et al.*, 1999), Irlanda (Graham *et al.*, 2001) y Brasil (Vilček *et al.*, 2004); VDVB-1b en los Estados Unidos (Ridpath *et al.*, 2010), Italia (Giammarioli *et al.*, 2008), España (Arias *et al.*, 2003), India (Mishra *et al.*, 2004), Perú (Ståhl *et al.*, 2009) y Chile (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006); VDVB-1a y VDVB-1b en Argentina (Jones *et al.*, 2001), Canadá (Pellerin *et al.*, 1994) y Japón (Nagai *et al.*, 2001; Matsuno *et al.*, 2007); VDVB-1a, VDVB-1b y VDVB-1c en Sudáfrica (Kabongo *et al.*, 2003); VDVB-1b y VDVB-1i en Bélgica (Couvreur *et al.*, 2002); VDVB-1c en Australia (Ridpath *et al.*, 2010); VDVB-1d en Finlandia (Vilček *et al.*, 2004), VDVB-1d y VDVB-1f en Eslovenia (Toplak *et al.*, 2004); VDVB-1e en Francia (Jackova *et al.*, 2008); VDVB-1e y VDVB-1h en Suiza (Bachofen *et al.*, 2008); VDVB-1h en Austria (Hornberg *et al.*, 2009) y VDVB-1l en Turquía (Yeşilbağ *et al.*, 2008).

A pesar de la alta cantidad de estudios que identifican genómicamente los aislados virales, las referencias sobre comportamientos antigénicos son más escasas, pero, de todas formas, se describen diferencias antigénicas significativas (con valores de similitud antigénica menor de 25) entre cepas de referencia de los subgrupos VDVB-1a y VDVB-1b (Avalos-Ramirez *et al.*, 2001), entre aislados de bovinos de Suiza de subgrupo VDVB-1k con los subgrupos VDVB-1a₁* y VDVB-1a₂**, y entre aislados de subgrupo VDVB-1e con los subgrupos VDVB-1a₂, VDVB-1b, VDVB-1h, y VDVB-1k (Bachofen *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayoría de los estudios encuentran valores de similitud antigénica sobre 25 cuando comparan virus de diferentes subgrupos dentro del genotipo VDVB-1, como por ejemplo, entre un aislado del subgrupo VDVB-1b de bovino y uno del subgrupo VDVB-1c de un yak, en India, se obtuvo un R de 35,5 (Behera *et al.*, 2011); entre aislados de los subgrupos

*VDVB-1a₁ corresponde a cepa de vacuna Bovilis® de VDVB-1a.

**VDVB-1a₂ corresponde a aislado de campo de VDVB-1a.

VDVB-1a, VDVB-1b y VDVB-1c obtenidos de bovinos norteamericanos y australianos se obtuvieron valores de R de 36, 39 y 52 (Ridpath *et al.*, 2010), pero los autores señalan que hay diferencias antigénicas entre los diferentes subgrupos, a pesar de ser valores por sobre el valor de referencia, que indica que valores menores o iguales a 25 determinan diferencias antigénicas significativas (Hubálek, 1982). Por el contrario, Bachofen *et al.* (2008), con valores de R entre 29 y 50 consideró que hubo similitud antigénica entre virus obtenidos de bovinos en Suiza, del subgrupo VDVB-1a₁* con los aislados de los subgrupos VDVB-1a₂**, VDVB-1b, VDVB-1h y VDVB-1e; del subgrupo VDVB-1a₂ con los subgrupos VDVB-1b y VDVB-1h; del subgrupo VDVB-1b con los subgrupos VDVB-1h y VDVB-1k; y del subgrupo VDVB-1h con el subgrupo VDVB-1k. También se ha considerado homogeneidad antigénica entre aislados virales de los subgrupos VDVB-1a, VDVB-1b VDVB-1d y VDVB-1f obtenidos de bovinos de Bélgica, a pesar de tener diferencias de título seroneutralizantes entre cero a seis diluciones (Couvreur *et al.*, 2002) y entre aislados de los subgrupos VDVB-1a y VDVB-1b obtenidos de bovinos de Japón en que las diferencias en los títulos neutralizantes fueron de dos diluciones (Nagai *et al.*, 2001). La suma de antecedentes anteriores dan cuenta que no existe uniformidad de criterio para establecer cuando dos aislados virales pueden considerarse antigénicamente similares o diferentes, pero, considerando las exigencias más estrictas (diferencias en los títulos seroneutralizantes mayores o iguales a cuatro diluciones y coeficiente de similitud antigénica inferior a 25), los aislados virales obtenidos de ovinos y caprinos de subgrupo VDVB-1j, de este estudio, resultaron significativamente diferentes a cepas de referencia del subgrupo VDVB-1a, a aislados de bovinos del subgrupo VDVB-1b y a aislados de camélidos sudamericanos del subgrupo VDVB-2a. Las diferencias con otros estudios del mismo tipo podrían atribuirse a mutaciones, que son frecuentes en los pestivirus, haciendo que su comportamiento antigénico no sea estable y que cada aislado, identificado en un subgrupo genómico, tenga características antigénicas propias que lo diferencian de otros en mayor o menor magnitud. También podría atribuirse a la adaptación del virus a hospederos diferentes al bovino, o bien, a errores de medición que se producen en estudios *in vitro* y que no son minimizados cuando no se hacen repeticiones de los experimentos.

Las variaciones antigénicas de los VDVB son de importancia relevante en programas de control y profilaxis, en especial cuando se quiere impedir la infección del feto para evitar el

*VDVB-1a₁ corresponde a cepa de vacuna Bovilis® de VDVB-1a.

**VDVB-1a₂ corresponde a aislado de campo de VDVB-1a.

nacimiento de animales PI, que son los mayores responsables de mantener las infecciones en los rebaños. Las investigaciones conducentes a lograr este objetivo, han demostrado que la aplicación de vacunas no siempre es efectiva ya que muchas veces la inmunidad lograda permite evitar los signos clínicos de la enfermedad, pero no es suficiente para controlar la viremia (Bolin y Ridpath, 1989; Cortese *et al.*, 1998; Beer *et al.*, 2000). Además, las vacunas que contienen solo el genotipo VDVB-1a no logran generar respuesta contra el VDVB-2a (Paton *et al.*, 1999; DesCôteaux *et al.*, 2003; Bachofen *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2009) y vacunas que contienen VDVB-1a y VDVB-2 no impiden la infección de fetos con el subgrupo VDVB-1b (Grooms *et al.*, 2007). Al respecto, en este estudio los sueros generados por las cepas de referencia de subgrupo VDVB-1a, con que se elaboran las vacunas, presentaron diferencias antigénicas marcadas con el subgrupo VDVB-1j y esta diferencia fue más marcada con el suero anti cepa Singer que es la cepa que contiene una de las vacunas que se aplican en el ganado bovino en Chile, mientras que los sueros generados por los aislados de subgrupo VDVB-1b presentaron mayor similitud antigénica con los aislados del subgrupo VDVB-1j. Además, las variaciones antigénicas son importantes en los procedimientos de diagnóstico, debido a que el empleo de una cepa patrón que presenta marcadas diferencias antigénicas con los virus nativos de una región puede entregar resultados distorsionados como, por ejemplo, en la detección y medición de respuestas inmune y en la identificación de aislados virales por pruebas de neutralización.

Se debe tener presente que en Chile se autoriza la aplicación de vacunas inactivadas para controlar la infección por VDVB en bovinos, existiendo en el mercado vacunas preparadas con VDVB-1a y VDVB-2a que de acuerdo a estos resultados, en un modelo conejo, generan anticuerpos que no neutralizan en la forma más eficiente al VDVB-1j, siendo este un subgrupo presente tanto en el ganado bovino como en ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos. Por lo anterior, sería de interés conocer, en las diferentes especies animales, la magnitud de la infección de subgrupos diferentes al VDVB-1a y VDVB-2a, la patogenicidad y la virulencia de los genotipos y subgrupos prevalentes en Chile, y la real inmunidad protectora de las vacunas existentes, a fin de aplicar vacunas que protejan en forma más eficiente al ganado.

CONCLUSIONES

En el estudio de comparación antigénica entre aislados y cepas de referencia de VDVB de distintos genotipos y subgrupos obtenidos desde ovinos, caprinos, bovinos y camélidos sudamericanos, se puede concluir que:

- Los aislados y cepas de referencia de los subgrupos VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1j y VDVB-2a, no presentan diferencias antigénicas significativas entre virus del mismo subgrupo, presentando valores de R de 44, 48, 44-64 y 61, respectivamente.
- Los virus del subgrupo VDVB-1j, no presentan diferencias antigénicas significativas entre virus aislados de las distintas especies (bovinos, ovinos y caprinos), presentando valores de R entre 51 y 64.
- Los virus del subgrupo VDVB-1j aislados de ovinos y caprinos, presentan diferencias antigénicas significativas con los virus de los subgrupos VDVB-1b aislados desde bovinos, con VDVB-2a aislados desde camélidos sudamericanos y con las cepas de referencia de bovinos del subgrupo VDVB-1a, con valores de R de 1, 4-8 y 2-3, respectivamente.
- Las cepas de referencia de bovinos del subgrupo VDVB-1a, presentan diferencias antigénicas significativas con los virus de los subgrupos VDVB-1b, VDVB-1j, y VDVB-2a, con valores de R de 14, 2-4 y 2, respectivamente.
- Los aislados del subgrupo VDVB-1b aislados desde bovino, presentan diferencias antigénicas significativas con los virus de los subgrupos VDVB-1j y VDVB-2a, con valores de R de 4-8 y 4, respectivamente.
- Los resultados obtenidos en esta memoria de título sugieren que las vacunas comerciales aplicables en bovino, que contienen los subgrupos VDVB-1a y VDVB-2a, no conferirían una buena inmunidad protectora frente a infecciones con los virus del subgrupo VDVB-1j en ovinos y caprinos en Chile.

BIBLIOGRAFÍA

AGUIRRE, I. 2009. Caracterización genotípica de pestivirus aislados de camélidos sudamericanos en Chile. Tesis Doctorado en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Campus Sur. 78 p.

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

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.

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

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

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

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: 93-102.

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

BARROS, S. C.; RAMOS, F.; PAUPÉRIO, S.; THOMPSON, G.; FEVEREIRO, M. 2006. Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. *Virus. Res.* 118: 192-195.

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.; SHANNON, A. D.; TAUTZ, N.; THIEL, H. J. 1994. Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology.* 198: 542-551.

BECHER, P.; KÖNIG, M.; PATON, D. J.; THIEL, H. J. 1995. Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology.* 209: 200-206.

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

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

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

BEER, M.; HEHNEN, H. R.; WOLFMAYER, A.; POLL, G.; KAADEN, O. R.; WOLF, G. 2000. A new inactivated BVDV genotype I and II vaccine. An immunisation and challenge study with BVDV genotype I. *Vet. Microbiol.* 77: 195-208.

BEHERA, S. P.; MISHRA, N.; VILČEK, Š.; RAJUKUMAR, K.; NEMA, R. K.; PRAKASH, A.; KALAIYARASU, S.; DUBEY, S. C. 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.

BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. 1989. Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Am. J. Vet. Res.* 50: 817-821.

BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. 1998. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 135-139.

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

BOTTON, S. A.; DA-SILVA, A. M.; BRUM, M. C.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. 1998. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31: 1429-1438.

CARLSSON, U. 1991. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 128: 145-147.

CARLSSON, U.; BELÁK, K. 1994. Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. *Acta Vet. Scand.* 35: 79-88.

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 diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 27-35.

CELEDÓN, M.; VARGAS, C.; SALINAS, A.; CASANOVA, A.; IBARRA, L.; BERRIOS, P. 1996. Prevalencias serológicas para el virus de la diarrea viral bovina y de la rinotraqueitis infecciosa bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. *Av. Cs. Vet.* 11: 75-80.

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

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

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

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

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

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

CORTESE, V. S.; GROOMS, D. L.; ELLIS, J.; BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F.; BROCK, K. V. 1998. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 59: 1409-1413.

COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; COLLARD, A.; QUENON, P.; DEHAN, P.; HAMERS, C.; PASTORET, P. P.; KERKHOFS, P. 2002. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res.* 85: 17-28.

DARBYSHIRE, J. 1962. Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of cattle. II. A serological relationship between a mucosal disease and swine fever. *Res. Vet. Sci.* 3: 123-128.

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.

DE MIA, G. M.; GREISER-WILKE, I.; FELIZIANI, F.; GIAMMARIOLI, M.; DE GIUSEPPE, A. 2005. Genetic characterization of a caprine pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup. *J. Vet. Med.* 52: 206-10.

DEREGT, D. 2005 BVD introduction and history. **In:** Goyal, S.M.; Ridpath, J.F. (Eds.). *Bovine Viral Diarrhea Virus Diagnosis, Management and Control.* Blackwell Publishing. Ames, USA. pp. 3-33.

DESCÔTEAUX, L.; CÉCYRE, D.; ELSENER, J.; BEAUCHAMP, G. 2003. Comparison of humoral immune responses in dairy heifers vaccinated with 3 different commercial vaccines against bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1. *Can. Vet. J.* 44: 816-821.

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.

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

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

FERNÁNDEZ, F.; COSTANTINI, V.; BARRANDEGUY, M.; PARREÑO, V.; SCHIAPPACASSI, G.; MALIANDI, F.; LEUNDA, M.; ODEÓN, A. 2009. Evaluation of experimental vaccines for bovine viral diarrhea in bovines, ovines and guinea pigs. *Rev. Argent. Microbiol.* 41: 86-91.

FULTON, R. W.; BURGE, L. J. 2000. Bovine viral diarrhea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. *Vaccine.* 19: 264-274.

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

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

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

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

GIAMMARIOLI, M.; LA ROCCA, S. A.; STEINBACH, F.; CASCIARI, C.; DE MIA, G. M. 2011. Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. *Vet. Microbiol.* 147: 231-236.

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

GILLESPIE, J. H.; BAKER, J. A.; MCENTEE, K. 1960. A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet.* 50: 73-79.

GILLESPIE, J. H.; COGGINS, L.; THOMPSON, J.; BAKER, J. A. 1961. Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease. *Cornell Vet.* 51: 155-159.

GRAHAM, D. A.; MCLAREN, I. E.; BRITTAIN, D.; O'REILLY, P. J. 2001. Genetic typing of ruminant pestivirus strains from Northern Ireland and the Republic of Ireland. *Res. Vet. Sci.* 71: 127-134.

GROOMS, D. L.; BOLIN, S. R.; COE, P. H.; BORGES, R. J.; COUTU, C. E. 2007. Fetal protection against continual exposure to bovine viral diarrhea virus following administration of a vaccine containing an inactivated bovine viral diarrhea virus fraction to cattle. *Am. J. Vet. Res.* 68: 1417-1422.

GUTEKUNST, D. E.; MALMQUIST, W. A. 1963. Separation of a soluble antigen and infectious particle of bovine viral diarrhoea viruses and their relationship to hog cholera. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 27: 121-123.

HARASAWA, R.; GIANGASPERO, M.; IBATA, G.; PATON, D. J. 2000. Giraffe strain of pestivirus: its taxonomic status based on the 5'-untranslated region. *Microbiol. Immunol.* 44: 915-921.

HORNBERG, A.; FERNÁNDEZ, S. R.; VOGL, C.; VILČEK, Š.; MATT, M.; FINK, M.; KÖFER, J.; SCHÖPF, K. 2009. Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet. Microbiol.* 135: 205-213.

HUBÁLEK, Z. 1982. Numerical comparative serology—the methods. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 307–318.

HUGHES, A.; KERSHAW, G.; SHAW, I. 1959. “B” or Border disease. An undescribed disease in sheep. *Vet. Rec.* 71: 313-317.

HURTADO, A.; GARCÍA-PÉREZ, A. L.; ADURIZ, G.; JUSTE, R. A. 2003. Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus Res.* 92: 67-73.

HURTADO, A.; ADURIZ, G.; GÓMEZ, N.; OPORTO, B.; JUSTE, R. A.; LAVÍN, S.; LÓPEZ-OLVERA, J. R.; MARCO, I. 2004. Molecular identification of a new pestivirus associated with increased mortality in the Pyrenean Chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Spain. *J. Wildl. Dis.* 40: 796-800.

HUSSIN, A.; WOLDEHIWET, Z. 1994. Border disease virus: A review. *Vet. Bull.* 64: 1131-1151.

INE. 2007. Existencia de ganado en las explotaciones agropecuarias y forestales por especie, según región. [en línea].

<http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/censos_agropecuarios/xls/2007/12_rev.xls>.

[consulta: 10-10-2011].

INE. 2011. Producción pecuaria, 2005-2010. [en línea].

<http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/200511/pecu_10180511.pdf>. [consulta: 10-10-2011].

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

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

JULIÁ, S.; CRAIG, M. I.; JIMÉNEZ, L. S.; PINTO, G. B.; WEBER, E. L. 2009. First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Prev. Vet. Med.* 90: 274-277.

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.

KIM, I. J.; HYUN, B. H.; SHIN, J. H.; LEE, K. K.; LEE, K. W.; CHO, K. O.; KANG, M. I. 2006. Identification of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Korean native goat (*Capra hircus*). *Virus Res.* 121: 103-106.

KIM, S. G.; ANDERSON, R. R.; YU, J. Z.; ZYLICH, N. C.; KINDE, H.; CARMAN, S.; BEDENICE, D.; DUBOVI, E. J. 2009. Genotyping and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from BVDV infected alpacas in North America. *Vet. Microbiol.* 136: 209-216.

KRAMETTER-FROETSCHER, R.; LOITSCH, A.; KOHLER, H.; SCHLEINER, A.; SCHIEFER, P.; MOESTL, K.; GOLJA, F.; BAUMGARTNER, W. 2006. Prevalence of antibodies to pestiviruses in goats in Austria. *J. Vet. Med.* 53: 48-50.

KRAMETTER-FROETSCHER, R.; KOHLER, H.; BENETKA, V.; MOESTL, K.; GOLJA, F.; VILČEK, Š.; BAUMGARTNER, W. 2007. Influence of communal alpine pasturing on the spread of pestiviruses among sheep and goats in Austria: first identification of border disease virus in Austria. *Zoonoses Public Health.* 54: 209-213.

KRAMETTER-FROETSCHER, R.; DUENSER, M.; PREYLER, B.; THEINER, A.; BENETKA, V.; MOESTL, K.; BAUMGARTNER, W. 2010. Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *Vet. J.* 186: 342-346.

LAMM, C. G.; BROADDUS, C. C.; HOLYOAK, G. R. 2009. Distribution of bovine viral diarrhoea virus antigen in aborted fetal and neonatal goats by immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 46: 54-58.

LEE, K. M.; GILLESPIE, J. H. 1957. Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* 18: 952-953.

LIESS, B.; MOENNIG, V. 1990. Ruminant pestivirus infection in pigs. *Rev. Sci. Tech.* 9: 151-161.

LIU, L.; XIA, H.; WAHLBERG, N.; BELÁK, S.; BAULE, C. 2009. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology.* 385: 351-357.

LOAN, R. W.; STORM, M. M. 1968. Propagation and transmission of hog cholera virus in nonporcine hosts. *Am. J. Vet. Res.* 29: 807-811.

LØKEN, T.; BJERKÅS, I.; HYLLSETH, B. 1982. Border disease in goats in Norway. *Res. Vet. Sci.* 33: 130-131.

LØKEN, T. 1995. Ruminant pestivirus infections in animals other than cattle and sheep. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11: 597-614.

MARCO, I.; ROSELL, R.; CABEZÓN, O.; MENTABERRE, G.; CASAS, E.; VELARDE, R.; LÓPEZ-OLVERA, J. R.; HURTADO, A.; LAVÍN, S. 2008. Epidemiological study of border disease virus infection in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). *Vet. Microbiol.* 127: 29-38.

MATSUNO, K.; SAKODA, Y.; KAMEYAMA, K.; TAMAI, K.; ITO, A.; KIDA, H. 2007. Genetic and pathobiological characterization of bovine viral diarrhoea viruses recently isolated from cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 515-520.

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

MISHRA, N.; PATTNAIK, B.; VILČEK, Š.; PATIL, S. S.; JAIN, P.; SWAMY, N.; BHATIA, S.; PRADHAN, H. K. 2004. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. *Vet. Microbiol.* 104: 207-212.

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

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

MÜLLER, C. 2003. Aislamiento e identificación de pestivirus y herpesvirus obtenidos de ovinos y caprinos de Chile. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria.

NAGAI, M.; ITO, T.; SUGITA, S.; GENNO, A.; TAKEUCHI, K.; OZAWA, T.; SAKODA, Y.; NISHIMORI, T.; TAKAMURA, K.; AKASHI, H. 2001. Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhea virus in Japan. Arch. Virol. 146: 685-696.

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

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

NETTLETON, P. F.; GILRAY, J. A.; RUSSO, P.; DLISSI, E. 1998. Border disease of sheep and goats. Vet. Res. 29: 327-340.

ODEPA. 2009. La zafra ovina 2008 - 2009. [en línea].

<<http://www.odepa.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2223.pdf>>. [consulta: 10-10-2011].

ODEPA. 2011. Balanza comercial de productos silvoagropecuarios. Avance mensual enero-Diciembre 2010. [en línea].

<http://www.odepa.cl/odepaweb/servicios-informacion/BalanMen/dic_10.pdf> [consulta: 10-10-2011].

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

PATEL, J. R.; DIDLICK, S.; QUINTON, J. 2005. Variation in immunogenicity of ruminant pestiviruses as determined by the neutralisation assay. Vet. J. 169: 468-472.

PATON, D. J.; SANDS, J. J.; LOWINGS, J. P.; SMITH, J. E.; IBATA, G.; EDWARDS, S. 1995a. A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet. Res.* 26: 92-109.

PATON, D. J.; CARLSSON, U.; LOWINGS, J. P.; SANDS, J. J.; VILČEK, Š.; ALENIUS, S. 1995b. Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Vet. Microbiol.* 43: 283-294.

PATON, D.; GUNN, M.; SANDS, J.; YAPP, F.; DREW, T.; VILČEK, Š.; EDWARDS, S. 1997. Establishment of serial persistent infections with bovine viral diarrhoea virus in cattle and sheep and changes in epitope expression related to host species. *Arch. Virol.* 142: 929-938.

PATON, D. J.; SHARP, G.; IBATA, G. 1999. Foetal cross-protection experiments between type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus in pregnant ewes. *Vet. Microbiol.* 64: 185-196.

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.

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

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

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

PLANT, J. W.; LITTLEJOHNS, I. E.; GARDINER, A. C.; VANTSIS, J. T.; HUCK, R. A. 1973. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. *Vet. Rec.* 92: 455.

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

PRATELLI, A.; MARTELLA, V.; CIRONE, F.; BUONAVOGLIA, D.; ELIA, G.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. 2001. Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in southern Italy. *J. Virol. Methods.* 94: 81-85.

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

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

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

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

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

RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D. 2000. Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhoea viruses. *J. Virol.* 74: 8771-8774.

RIDPATH, J. F. 2010. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26: 105-121.

RIDPATH, J. F.; FULTON, R. W.; KIRKLAND, P. D.; NEILL, J. D. 2010. Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22: 184-191.

RIDPATH, J. F.; LOVELL, G.; NEILL, J. D.; HAIRGROVE, T. B.; VELAYUDHAN, B.; MOCK, R. 2011. Change in predominance of Bovine viral diarrhoea virus subgenotypes among samples submitted to a diagnostic laboratory over a 20-year time span. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23: 185-193.

ROEHE, P. M.; WOODWARD, M. J.; EDWARDS, S. 1992. Characterisation of p20 gene sequences from a border disease-like pestivirus isolated from pigs. *Vet. Microbiol.* 33: 231-238.

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.

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

SCHIRRMEIER, H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K.; HOFFMANN, B.; BEER, M. 2004. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 85: 3647-3652.

SNOWDON, W.A. 1973. Mucosal disease: its incidence and diagnosis in Australia. *Bull. Off. Int. Epiz.* 79: 529–542.

STÅHL, K.; KAMPA, J.; ALENIUS, S.; PERSSON WADMAN, A.; BAULE, C.; AIUMLAMAI, S.; BELÁK, S. 2007. Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus--implications for BVD control and for the safety of biological products. *Vet. Res.* 38: 517-523.

STÅHL, K.; BENITO, A.; FELMER, R.; ZUÑIGA, J.; REINHARDT, G.; RIVERA, H.; BAULE, C.; MORENO-LÓPEZ, J. 2009. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. *Pesq. Vet. Bras.* 29: 41–44.

STALDER, H. P.; MEIER, P.; PFAFFEN, G.; WAGECK-CANAL, C.; RÜFENACHT, J.; SCHALLER, P.; BACHOFEN, C.; MARTI, S.; VOGT, H. R.; PETERHANS, E. 2005. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 72: 37-41.

STRONG, R.; LA ROCCA, S. A.; IBATA, G.; SANDVIK, T. 2010. Antigenic and genetic characterisation of border disease viruses isolated from UK cattle. *Vet. Microbiol.* 141: 208-215.

SULLIVAN, D. G.; CHANG, G. J.; AKKINA, R. K. 1997. Genetic characterization of ruminant pestiviruses: sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep. *Virus Res.* 47: 19-29.

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

THABTI, F.; LETELLIER, C.; HAMMAMI, S.; PÉPIN, M.; RIBIÈRE, M.; MESPLÈDE, A.; KERKHOFS, P.; RUSSO, P. 2005. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch. Virol.* 150: 215-229.

THIEL, H. J.; PLAGEMANN, P.; MOENNIG, V. 1996. Pestiviruses. **In:** Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.). *Fields Virology*, 3^o Edición. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, USA. pp. 1059-1073.

THIEL, H. J.; COLLETT, M.S.; GOULD E. A.; et al.: 2005. Family *Flaviviridae*. **In:** Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; et al. (Eds.). *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. pp. 981-998. (citado por RIDPATH, J. F. 2010. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26: 105-121).

TOPLAK, I.; SANDVIK, T.; BARLIČ-MAGANJA, D.; GROM, J.; PATON, D. J. 2004. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Vet. Microbiol.* 99: 175-185.

VALDAZO-GONZÁLEZ, B.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, M.; GREISER-WILKE, I. 2006. Genetic typing and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain. *Vet. Microbiol.* 117: 141-153.

VAN RIJN, P. A.; VAN GENNIP, H. G.; LEENDERTSE, C. H.; BRUSCHKE, C. J.; PATON, D. J.; MOORMANN, R. J.; VAN OIRSCHOT, J. T. 1997. Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology.* 237: 337-348.

VAN RIJN, P. A. 2007. A common neutralizing epitope on envelope glycoprotein E2 of different pestiviruses: implications for improvement of vaccines and diagnostics for classical swine fever (CSF)? *Vet. Microbiol.* 125: 150-156.

VILČEK, Š.; HERRING, A. J.; HERRING, J. A.; NETTLETON, P. F.; LOWINGS, J. P.; PATON, D. J. 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136: 309-323.

VILČEK, Š.; BELÁK, S. 1996. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J. Virol. Methods.* 60: 103-108.

VILČEK, Š.; NETTLETON, P. F.; PATON, D. J.; BELÁK, S. 1997. Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.* 78: 725-735.

VILČEK, Š.; BJÖRKLUND, H. V.; HORNER, G. W.; MEERS, J.; BELÁK, S. 1998. Genetic typing of pestiviruses from New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 46: 35-37.

VILČEK, Š.; DREW, T. W.; MCGOLDRICK, A.; PATON, D. J. 1999. Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales. *Vet. Microbiol.* 69: 227-237.

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

VILČEK, Š.; ĎURKOVIČ, B.; KOLESÁROVÁ, 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.

VILČEK, Š.; RIDPATH, J. F.; VAN CAMPEN, H.; CAVENDER, J. L.; WARG, J. 2005. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res.* 108: 187-193.

VILČEK, Š.; NETTLETON, P. F. 2006. Pestiviruses in wild animals. *Vet. Microbiol.* 116: 1-12.

WAKELEY, P. R.; TURNER, J. L.; IBATA, G.; KING, D. P.; SANDVIK, T.; HOWARD, P.; DREW, T. W. 2004. Characterisation of a type 2 bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle in the UK. *Vet. Microbiol.* 102: 19-24.

WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C. 1988. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Res. Vet. Sci.* 45: 143-148.

WENTZ, P. A.; BELKNAP, E. B.; BROCK, K. V.; COLLINS, J. K.; PUGH, D. G. 2003. Evaluation of bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223: 223-228.

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

ANEXO N° 1



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. María 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.-

Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, CHILE
Teléfono (56-2) 978 5568 - Fax (56-2) 516 7253 - E-mail:esc-vete@abello.dic.uchile.cl

ANEXO N° 2



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