



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN GENÓMICA DE
PESTIVIRUS OBTENIDOS DE ALPACAS (*Lama pacos*), LLAMAS
(*Lama glama*), Y GUANACOS (*Lama guanicoe*) DE LA REGIÓN
METROPOLITANA, CHILE

JEANNETE IVONNE OSORIO VIDAL

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

PROFESOR GUÍA: MARÍA O. CELEDÓN VENEGAS

Esta memoria forma parte del proyecto Fondecyt 1981193

SANTIAGO-CHILE

2012



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN GENÓMICA DE
PESTIVIRUS OBTENIDOS DE ALPACAS (*Lama pacos*), LLAMAS
(*Lama glama*), Y GUANACOS (*Lama guanicoe*) DE LA REGIÓN
METROPOLITANA, CHILE

JEANNETE IVONNE OSORIO VIDAL

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

NOTA FINAL:

NOTA

FIRMA

PROFESOR GUÍA: MARÍA O. CELEDÓN VENEGAS

.....

.....

PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ PIZARRO LUCERO

.....

.....

PROFESOR CONSEJERO: LUIS IBARRA MARTÍNEZ

.....

.....

SANTIAGO-CHILE

2012

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS.....	3
1.1. GENERALIDADES.....	3
1.2 IMPORTANCIA PRODUCTIVA DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS	7
1.3. ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS	9
2. INFECCION POR PESTIVIRUS	12
2.1. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB)	12
2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS PESTIVIRUS	14
2.3. EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB)	15
2.4. COMPLEJO DIARREA VIRAL BOVINA / ENFERMEDAD MUCOSA (DVB/EM)	15
2.5. ENFERMEDAD DE LA FRONTERA (EF).....	17
2.6 INFECCIÓN POR PESTIVIRUS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS ...	20
2.7. DIAGNÓSTICO.....	21
2.8 SITUACIÓN EN CHILE	23
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
MUESTRAS	26
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	27
1. PROCESAMIENTO DE SANGRE PERIFÉRICA	28
2. PROCESAMIENTO DE ÓRGANOS.....	28
PREPARACIÓN DE CULTIVOS CELULARES.....	29
AISLAMIENTO VIRAL.....	30
PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD)	31
PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA (IPI).....	32
CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LOS AISLADOS DE PESTIVIRUS.....	32
AMPLIFICACIÓN DE AISLADOS DE PESTIVIRUS.....	33
EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL.....	33
REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT).....	34
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	35
ELECTROFORESIS DE LOS FRAGMENTOS DE ADN OBTENIDOS EN RT-PCR.....	35
DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS	36
ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE LA DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	36
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

RESUMEN

Se evalúa la hipótesis que camélidos sudamericanos (CS) introducidos en la Región Metropolitana de Chile estén infectados con pestivirus. Para realizar el aislamiento viral se tomaron muestras de 79 CS (42 alpacas vivas, 30 llamas vivas, una llama muerta, un feto de llama abortado, cuatro guanacos vivos y un guanaco muerto) procedentes de cinco rebaños sospechosos de estar infectados con pestivirus. Las muestras se inocularon en cultivos primarios de células de pulmón fetal bovino libre de virus diarrea viral bovina (VDVB) y se hicieron cinco pasajes antes de ser analizados por las pruebas de inmunofluorescencia directa e inmunoperoxidasa indirecta para detectar la presencia de antígenos de pestivirus. Para la caracterización molecular un fragmento de la región no traducida 5' (5'-UTR) del ARN de cada aislado fue amplificado por transcripción reversa de reacción en cadena de las polimerasas (RT-PCR) y tratado con las enzimas de restricción *Pst I*, *Bgl I* y *Xho I* para identificar la especie de los virus

Los resultados muestran que 37 CS (17 alpacas, 16 llamas y cuatro guanacos de los cinco rebaños) estaban infectados con pestivirus. Todos los aislados fueron no citopatógenicos. El VDVB genotipo 1 (VDVB-1) fue aislado de 6 alpacas y VDVB genotipo 2 (VDVB-2) fue aislado de 11 alpacas, 16 llamas y 4 guanacos. Los aislados virales fueron obtenidos de 14 alpacas sanas, 3 alpacas que abortaron, 13 llamas sanas, dos llamas con aborto, una llama muerta sin antecedentes clínicos y tres guanacos con enfermedad respiratoria y uno muerto con enfermedad respiratoria.

Se concluye que alpacas, llamas y guanacos de la Región Metropolitana de Chile están infectados con VDVB-1 y VDVB-2.

SUMMARY

This study evaluates the hypothesis that South American Camelids (SAC) introduced to the Metropolitan Region of Chile are infected with pestiviruses. In order to perform viral isolation, samples were taken from 79 SAC (42 live alpacas, 30 live llamas, 1 dead llama, 1 aborted foetus of llama, 4 live guanacos and 1 dead guanaco), coming from 5 flocks suspected to be infected with pestivirus. The samples were inoculated in primary culture of bovine foetus lung cells, free of bovine viral diarrhoea virus (BVDV), passing each sample 5 times, and were then analyzed by direct immunofluorescence and indirect immunoperoxidase techniques to detect the presence of pestivirus antigens. For molecular characterization, a fragment of the 5'-untranslated region (5'-UTR) of RNA of the isolates was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and treated with restriction enzymes *Pst I*, *Bgl I* and *Xho I* in order to identify species of viruses.

The results show that 37 SAC (17 alpacas, 16 llamas and 4 guanacos from the 5 studied flocks) were infected with pestivirus. All isolates were non cytopathogenic. BVDV genotype 1 (BVDV-1) was isolated from 6 alpacas while BVDV genotype 2 (BVDV-2) was isolated from 11 alpacas, 16 llamas and 4 guanacos. The viral samples were obtained from 14 healthy alpacas, 3 alpacas with abortion, 13 healthy llamas, 2 llamas with abortion, 1 dead llama without clinical history, 3 guanacos with respiratory disease and 1 dead guanaco with respiratory disease. It is concluded that alpacas and llamas from the Metropolitan Region of Chile are infected with BVDV-1 and BVDV-2.

INTRODUCCIÓN

El grupo de los camélidos sudamericanos (CS) está formado por cuatro especies que se clasifican en camélidos silvestres: guanaco (*Lama guanicoe*) y vicuña (*Vicugna vicugna*) y domésticos: llama (*Lama glama*) y alpaca (*Lama pacos*). En Sudamérica, la población estimada de CS es de 7 millones, aproximadamente y Chile posee 229.000 ejemplares.

Aun cuando, la población de CS representa el 1% de la ganadería nacional, las especies domésticas, alpacas y llamas, cumplen un rol social importante, especialmente, para la población indígena que se ubica en el altiplano de las Regiones de Arica y Parinacota y de Tarapacá, sirviendo como fuente importante de proteína, vestuario, transporte y medicina y en oficios religiosos. Además, la comercialización de la fibra, que es considerada de alto valor, y la exportación de animales en pie a Estados Unidos, Australia y algunos países europeo, así como el enriquecimiento del paisaje que constituye un atractivo turístico, son recursos aprovechables por parte de sus criadores.

La crianza de alpacas y llamas es una de las pocas actividades ganaderas que puede desarrollarse en terrenos geográficos ubicados en las grandes alturas y recientemente está adquiriendo un progresivo desarrollo en otras regiones de Chile. Es así como, se ha intentado impulsar la ganadería de CS por medio de su introducción, principalmente de alpacas, en otras regiones del país, lo que implica transportarlas a ambientes diferentes y en contacto con ganado doméstico, con alta probabilidad de contraer diversos tipos de infecciones.

El género *Pestivirus* incluye cuatro especies virales que afectan a animales biungulados domésticos y silvestres: el virus de la diarrea viral bovina genotipo 1 (VDVB-1) y virus diarrea viral bovina genotipo 2 (VDVB-2) del bovino, el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) del ovino y el virus de la peste porcina clásica (PPC) del porcino.

El VDVB se considera como agente causal de grandes pérdidas económicas en el ganado y en Chile está ampliamente distribuido en la población

bovina y también en ovinos y caprinos. Hasta el momento, en rebaños de alpacas y llamas establecidos en la Región Metropolitana se han pesquisado animales con anticuerpos para el VDVB y se ha aislado pestivirus, desconociéndose si es una infección con VDVB-1, con VDVB-2, con VEF o bien un pestivirus propio de la especie camélido, de tal modo que surge la necesidad de aislar e identificar a los pestivirus que están infectando a estas especies.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

1.1. GENERALIDADES

Los Camélidos Sudamericanos (CS), así como los camellos del viejo mundo, se clasifican taxonómicamente en el orden *Artiodactyla*, suborden *Tylopoda*, y familia *Camelidae*. A nivel de tribu se dividen en *Lamini* y *Camelini*, y a nivel de género en *Lama* y *Vicugna* para animales del nuevo mundo. Ambas tribus se originaron en América del Norte durante el Plioceno. Al final de este periodo los *Camelini* migraron al Asia y los *Lamini* a América del Sur, donde se adaptaron a zonas áridas y semiáridas (Wheeler, 1991)

Actualmente los CS incluyen cuatro especies, dos de ellas domésticas y dos silvestres. Los camélidos domésticos son la alpaca (*Lama pacos*) y la llama (*Lama glama*) y los camélidos silvestres la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*) (FIA, 2000). Existen dos razas de alpacas, la Suri y la Huacaya, esta última la más numerosa en Chile y a pesar de no existir selección a su favor, es más rústica que la raza Suri y tiene mayor resistencia al medio, estando bien adaptadas al clima frío. Las alpacas de la raza Suri se encuentran casi exclusivamente en Perú, en general, esta raza presenta mayor incidencia de mortalidad y necesita climas más benignos que la Huacaya (Bonacic, 1991).

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

hasta el lago Poopo, en Bolivia, y el noroeste de Argentina. La llama se distribuye desde la zona de Pasto, Colombia (1° latitud Norte) hasta aproximadamente 27° en el centro de Chile, pero la zona de mayor productividad está ubicada entre 11° y 21° latitud sur en las punas alto andinas cubriendo menos territorio y diversidad ecológica que el guanaco. Este último se encuentra en poblaciones dispersas a lo largo de los Andes, desde aproximadamente 8° latitud sur, hasta la isla Navarino, Chile, a 55° latitud sur en Tierra del Fuego (Wheeler, 1991).

Diversas investigaciones arqueológicas señalan con certeza que los CS viven en su actual ambiente hace por lo menos unos 10.000 años (Sumar, 1997).

Del total de CS existentes en el mundo, la mayoría se encuentra distribuida en sus zonas de origen que son los países andinos sudamericanos como Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay y Perú (FAO, 2005). El Cuadro 1 muestra la población de CS en los países andinos, de acuerdo a lo comunicado por diversas fuentes y corregido para Chile con la información disponible en el VI Censo Agropecuario Nacional (INE, 1997) y FIA (2002).

Cuadro 1: Población aproximada de camélidos sudamericanos en países andinos

Países	Guanacos	Vicuñas	Llamas	Alpacas	Total ¹
Argentina	578.700	23.000	135.000	400	737.100
Bolivia	54	12.047	2.022.569	324.336	2.359.006
Chile	73.000 a 86.000*	25.000	79.294	45.244	229.038
Colombia			200		200
Ecuador		482	9.687	100	10.269
Paraguay	53				53
Perú	1.600	97.670	989.593	2.510.912	3.599.775
Total	653.9071	158.199	3.236.343	2.880.992	6.935.441

FAO 2005 (actualizado para Chile con cifras VI Censo Agropecuario INE 1997 y FIA 2002).

* estimación SAG (FIA, 2002).

1 Total calculado con promedio de la estimación de guanacos.

En cuanto a la distribución en el país de los camélidos sudamericanos domésticos, según datos del VII Censo Agropecuario, existe presencia de ejemplares en todo el territorio nacional, pero con altas concentraciones en las

regiones extremas (Cuadro 2). En las Regiones de Arica y Parinacota y de Tarapacá se concentra el 86,2% de las alpacas y el 83,7% de las llamas. En el resto de las regiones los porcentajes no superan el 2% de la participación total, excepto en la Región de Antofagasta, que posee un 6,86% de las llamas. Sólo el guanaco se muestra como una especie más cosmopolita, que se distribuye naturalmente a lo largo de todo el territorio nacional, aún cuando la mayor parte de los individuos se concentran significativamente en la Región de Magallanes y Antártica Chilena (INE, 2007).

Las potencialidades productivas en las zonas altoandinas son marginales, principalmente por las temperaturas que rigen, con promedios de 4 – 8° C, con fluctuaciones muy grandes entre el día y la noche. La vegetación natural consiste, principalmente, en gramíneas de lento crecimiento como algunas festucas, mulhenbergias y calamagrostis. La mayor parte de la vegetación en las altas cumbres es muy pequeña y leñosa (FIA, 2000). Bajo estas condiciones es muy difícil poder implementar otro sistema pecuario.

Las zonas altiplánicas donde habitan los CS parecen haber alcanzado o sobrepasado el límite de capacidad de carga, por lo que, con un objetivo primeramente experimental para dar paso a un objetivo productivo, el crecimiento de la población se orienta a la transferencia de rebaños a la zona central y sur del país.

Existen diversos antecedentes de traslados de CS fuera de los países andinos. En el siglo XX a partir de 1979 Chile, en su condición de país libre de fiebre aftosa, exportó animales a Estados Unidos, España, Israel, Irak, Brasil, Nueva Zelanda, Australia, Ecuador y Canadá (Sumar, 1997), países que han desarrollado la producción alcanzando una cantidad de ejemplares no despreciable. Es así como el “Camelid ID Working Group” de Estados Unidos, estima que la población de CS domésticos en ese país está entre 300.000 a 325.000 (Kapil *et al.*, 2009), valor que supera ampliamente la población total de CS domésticos de Chile publicada en el VII Censo Agropecuario (INE, 2007).

Cuadro 2: Existencia de ganado en las explotaciones agropecuarias y forestales por especie, según Región, Chile, 2007

	Alpacas		Llamas	
	Informantes	Cabezas	Informantes	Cabezas
Total país	755	26.147	1.243	48.989
I de Tarapacá	165	3.476	481	23.656
II de Antofagasta	43	234	201	5.643
III de Atacama	3	8	4	36
IV de Coquimbo	13	132	27	207
V de Valparaíso	16	159	33	214
VI de O'Higgins	47	516	9	53
VII del Maule	40	380	3	31
VIII del Bío-Bío	23	57	28	177
IX de La Araucanía	52	476	89	661
X de Los Lagos	38	465	65	348
XI Aysen	33	191	0	0
XII de Magallanes y Antártica Chilena	11	430	8	90
Región Metropolitana de Santiago	10	45	21	88
XIV de Los Ríos	37	512	45	393
XV de Arica y Parinacota	224	19.066	229	17.392

VII Censo agropecuario (INE 2007)

Según ProChile (1993), Australia es uno de los países que ha importado alpacas, por el potencial como animal productor de fibra de alta calidad, convirtiéndose este país en el principal exportador de fibra y carne por lo cual, ha desarrollado la tecnología más avanzada para conseguir una alta calidad en estos dos rubros (FIA, 2000).

1.2 IMPORTANCIA PRODUCTIVA DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Para las distintas zonas del territorio nacional, tanto las especies explotables alpacas y llamas y aquellas con restricción de manejo en su explotación comercial como lo son la vicuña y el guanaco, presentan oportunidades de desarrollo mediante la obtención de productos y subproductos como la fibra textil, la carne y el cuero, algunos de los cuales muestran interesantes perspectivas de mercado, especialmente en el exterior. Además, existen áreas geográficas en que estos animales representan un elemento característico del paisaje y por ello su presencia contribuye a enriquecer el patrimonio turístico, particularmente en la línea del ecoturismo.

Las fibras finas, incluyendo en este rubro la de alpaca, representan sólo el 2,5% del total mundial de exportación de fibras de origen animal. En el caso del pelo de llama y alpaca, también influye la baja calidad del producto en bruto, ya sea por la poca tecnología empleada en su cosecha y clasificación, por los costos agregados a su selección y procesamiento o por la escasa promoción de los productos en los diferentes mercados a nivel mundial. En Chile la obtención de vellón se realiza cada dos y hasta tres años utilizando herramientas muy rudimentarias (FIA, 2000). De acuerdo a la FAO (2005), la exportación de fibra desde el norte de Chile se activa aparentemente frente a aumentos de la demanda internacional. Las exportaciones se basan en una oferta local regular que sólo ascendería a aproximadamente 30 toneladas anuales. Ante una demanda mayor, el volumen se completa con aportes de las regiones bolivianas fronterizas. El producto exportado corresponde a materia prima sucia de llama y alpaca, que se envía separada por colores.

Con relación a la producción de carne, según antecedentes de la FAO (2005), en Chile el consumo de carne de camélido se asoció a la recesión económica de la década del 80. Se produjo una sustitución de los tipos tradicionales de carne, especialmente de vacuno, por la carne CS domésticos, la cual tiene un valor que es la mitad de la primera. En Arica el consumo aumentó en un 608% entre 1980 y 1989. En el año 2000, se estima que, aproximadamente

un 10 a 15% del rebaño se destinó a matanza, para autoconsumo o venta local. En el caso de las llamas se obtienen 44 kilos en vara y de las alpacas 29 kilos en vara.

Espíndola (1997) señala que la mayoría de los ganaderos no tienen una vinculación directa con el mercado, por otra parte la producción de la carne de camélidos no obedece hoy a ningún parámetro comercial y tampoco está enfocada a los requerimientos específicos de un mercado de la carne, de modo que la producción vendida por el productor es un subproducto de la crianza familiar, lo cual indica que se trata de un sistema de producción de tipo tradicional con una baja aplicación de tecnología.

De acuerdo a las cifras oficiales entregadas por el INE (1997), el porcentaje de camélidos faenados (considerando solamente el beneficio en mataderos de Arica) corresponde a un 0,15% del total de animales de abasto beneficiados en el país, sin embargo, en Arica son la especie de mayor significación (60,78%), superando a la suma de bovinos, ovinos y porcinos (FIA, 2000). En Chile el consumo no se ha extendido al resto del país, pero se han hecho estudios de rendimiento, calidad y composición de la carne, y también algunas experiencias en producción de cecinas con carne de llama, en el sur de Chile (FAO, 2005).

Según algunos estudios realizados con relación a la carne de guanaco, ésta tiene mucha similitud, tanto nutricionalmente como en sus características organolépticas, con la carne de bovino, pero, uno de los mayores problemas para una eventual comercialización es la presentación de un gran porcentaje de animales con microquistes de *Sarcocystis*, parásito que se ubica en el interior de los músculos, dañando la apariencia del producto. De todas formas, su mayor utilización es en forma de charqui (FIA, 2000).

Las pieles y cueros de camélidos domésticos se comercializan en forma fresca o salada. El mejor mercado es el de las pieles de las crías nonatas de madres que abortan en los últimos meses de gestación y de crías post-natales que mueren por alguna razón, las que se venden como "baby-alpaca" y que son muy apreciados en algunos mercados a nivel internacional (FIA, 2000).

1.3. ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

El conocimiento e impacto de las enfermedades infecciosas en CS se ha hecho más conocida, en los últimos 10 años, gracias al acceso de veterinarios y criadores a información científica proporcionada por nuevas investigaciones, así como, por la contribución de información por parte de los criadores y registros de laboratorios de diagnóstico involucrados en la salud, tratamiento y diagnóstico de las enfermedades de los CS. Las revisiones sobre enfermedades que afectan a los CS tienden a reflejar el estado de algunas infecciones virales en una región estableciendo un sesgo contra un conocimiento más global de los reales efectos potenciales de las infecciones virales sobre estas especies (Kapil *et al.*, 2009).

La susceptibilidad a sufrir enfermedades está controlada por la inmunidad innata y adquirida. Estudios filogenéticos de citoquinas inflamatorias IL-1, IL-1 α y IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 y TNF- α indican que las secuencias genéticas de citoquinas de CS están más estrechamente relacionadas a las citoquinas de cerdos, bovinos, ovejas y equinos que a las citoquinas de humanos, perros, gatos y ratas (Odbileg *et al.*, 2005). Es sabido que estas citoquinas juegan un importante rol en el resultado de una enfermedad infecciosa, de este modo, no sorprende que muchas de las enfermedades que afectan a los CS estén relacionadas a virosis de bovinos, equinos, ovinos y cerdos (Kapil *et al.*, 2009) y la adquisición de las infecciones se debería a contagio interespecie (Evermann, 2006).

Tanto en alpacas como en llamas se describen enfermedades bacterianas tales como: enterotoxemia causada por *Clostridium perfringens* tipo A, C y D, afectando principalmente a las crías con altas tasas de morbi-mortalidad (Parreño y Marcoppido, 2006); colibacilosis producida por *Escherichia coli*, principalmente asociada a diarreas neonatales (Parreño y Marcoppido, 2006) y en adultos es más común en infecciones uterinas, mastitis y abscesos (Fowler, 1994); también se ha reportado un caso de meningoencefalitis con absedación en una cría de alpaca, con bajo consumo de calostro (Tsur *et al.*, 1996), además se describen infecciones mixtas en conjunto con salmonella y rotavirus (Parreño *et al.*, 2001). Dentro de las enfermedades sistémicas se han registrado casos de ántrax, tuberculosis,

brucelosis, paratuberculosis, listeriosis, leptospirosis, estreptococosis y rodococosis (Parreño y Marcoppido, 2006).

Entre las enfermedades virales que afectan a los CS se describe la estomatitis vesicular como una enfermedad poco frecuente en llamas y con evidencias serológicas en alpacas (Rivera *et al.*, 1987); el virus de la fiebre aftosa, inoculado en forma experimental, produce lesiones en las extremidades, y al parecer, los CS son menos susceptibles que los bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, bisontes y ciervos, (Lubroth *et al.*, 1990); el virus papiloma se ha aislado de fibropapilomas mucocutáneos de alpacas y llamas con un 76% de homología con virus papiloma bovino 1 (Schulman *et al.*, 2003); adenovirus se ha detectado en parénquima pulmonar de llamas con bronconeumonía, peritonitis y pleuritis fibrinosa y hepatitis (Galbreath *et al.*, 1994); Rotavirus está documentado como causal de diarreas (Whitehead y Anderson, 2006) y es una de las infecciones más comunes en CS con seroprevalencias de 77% a 98% (Parreño *et al.*, 2004); coronavirus es la causa más común de enteritis viral en crías y adultos (Topliff *et al.*, 2009), un reporte señala que coronavirus estuvo involucrado en el 42% de los casos de diarrea (Cebra *et al.*, 2003), además, se ha aislado coronavirus bovino del grupo antigénico 2 de una alpaca de 4 años con diarrea crónica y coronavirus del grupo antigénico 1 de alpacas con síndrome respiratorio agudo (Kapil *et al.*, 2009); virus herpes equino 1 (VHE-1) se aisló de un brote de ceguera y encefalitis que se presentó en un grupo de 100 camélidos en Nueva York, después de un año de haber sido importados desde Chile (Rebhun *et al.*, 1988), además, en Chile se detectó seropositividad para VHE-1 en el 25% de 52 muestras de sueros provenientes de alpacas, llamas, guanacos y vicuñas (Vergara, 2004); el virus herpes bovino 1 (VHB-1) se aisló desde una llama con bronconeumonía (Williams *et al.*, 1991), y se ha detectado seropositividad en alpacas de Perú (Rivera *et al.*, 1987), en llamas y vicuñas de Argentina, en tanto que en Chile, en una muestra de sueros de 74 alpacas, 43 llamas, 48 guanacos y 34 vicuñas, no se detectaron anticuerpos para el VHB-1 (Celedón *et al.*, 2001); el virus parainfluenza 3 (PI-3) se ha aislado de guanacos en Chile (Laboratorio Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile), en Perú se describe

seroprevalencia de un 71,1%, y en Chile en una muestra de 370 sueros procedentes de alpacas, llamas, guanacos y vicuñas de diferentes regiones se detectó seropositividad de 24,6% (Cepeda *et al.*, 2011); los reportes de infección por virus de la rabia en CS son escasos, pero puede ocurrir transmisión entre ellos y cuando ocurre se presenta en forma agresiva más que paralítica con síntomas de automutilación ataque a personas y parálisis faríngea (Kapil, 2009). En infecciones producidas por arbovirus, se describe que los CS son susceptibles de sufrir encefalitis por virus de la encefalitis del este, del oeste y venezolana (Nolen-Walston., *et al* 2007), se dispone de reportes de encefalitis por virus del oriente del Nilo en alpacas de 3 a 7 años de edad (Dunkel *et al.*, 2004). Se reporta infección letal con el virus de la lengua azul (género *Orbivirus* de la familia *Reoviridae*) en una alpaca de cinco años con una cría, que antes de morir presentó enfermedad respiratoria, erosiones y úlceras en lengua, paladar y mucosa bucal (Henrich *et al.*, 2007); respecto del virus de la arteritis viral equina, éste se detectó, por RT-PCR, en tejidos de un feto de alpaca abortado en el último tercio de gestación y seropositividad al virus en todos los animales del rebaño (Kapil, 2009); se describe positividad para retrovirus en macrófagos y linfonódulos de una llama con historia de 6 meses de pérdida de peso, cojera e infecciones oportunistas (Underwood *et al.*, 1992).

En relación a infecciones por virus diarrea viral bovina (VDVB), en un principio se dudó de la potencialidad del virus para producir enfermedades en los CS debido a que las primeras evidencias se centraron en estudios serológicos y reportes esporádicos de infecciones virales asociadas con enfermedades respiratorias, enfermedades entéricas y abortos ocasionales, no obstante, hoy se conoce fehacientemente que el VDVB está involucrado en casos de diarreas, falta de crecimiento, pérdidas reproductivas, enfermedades diseminadas y efectos multisistémicos de manera similar a las infecciones con VDVB en bovinos, ovinos y caprinos (Belknap *et al.*, 2000; Everman, 2006; Byers *et al.*, 2009).

Las incidencias serológicas para el VDVB en los CS varían entre 4,4% (Belknap *et al.*, 2000) a tan alto como 53% (Everman, 2006). Un ensayo en 223 llamas y alpacas en 11 rebaños en Alabama, Georgia y Tennessee mostraron una

seroprevalencia de 0,9% (Wentz *et al.*, 2003); en otro estudio que involucró 63 rebaños de alpacas en Estados Unidos, 16 (25,4%) resultaron con crías positivas y cuatro (6,3%) tuvieron alpacas PI (Topliff *et al.*, 2009). En una pesquisa serológica en alpacas y rumiantes pequeños en Suiza no se detectó seropositividad en alpacas, pero hubo 12,9% de ovejas y un 10,2% de cabras positivas (van Amstel y Kennedy, 2010). En Argentina, un ensayo en 390 llamas mostró una seroprevalencia de 2,05% (Puntel *et al.*, 1999) y en Perú se describe una seroprevalencia de 11,1% en una muestra de 100 alpacas (Rivera *et al.*, 1987). En Chile se ha detectado serología positiva para el VDVB de 10,8% en una muestra de 74 alpacas y de 14% en una muestra de 43 llamas ubicadas en la Región Metropolitana, en tanto que, no se pesquisó anticuerpos para el VDVB en los sueros de 48 guanacos, 34 vicuñas (Celedón *et al.*, 2001), 136 alpacas y 30 llama del altiplano de la Región de Tarapacá (Fuentes, 2007).

2. INFECCIÓN POR PESTIVIRUS

2.1. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB)

EL VDVB pertenece al género *Pestivirus* que se ubica dentro de la familia *Flaviviridae* (Murphy *et al.*, 1995). Los pestivirus, son virus envueltos y pequeños de 40 a 60 nm de diámetro, con un genoma que consiste en una hebra de ARN de polaridad positiva de alrededor de 12,5 Kb. Este ARN tiene un marco de lectura abierto, llamado “ORF” (del inglés “open reading frame”) de aproximadamente 11.000 bases, que codifica para una poliproteína cuyo procesamiento, mediado por proteasas virales y celulares, dará origen a las proteínas estructurales y no estructurales del virión (Thiel *et al.*, 1996; Becher *et al.*, 1998). En los extremos 5’ y 3’ del ARN existen regiones que no codifican para proteínas, llamadas “UTR” (del inglés “un translation region”) de alrededor de 360-385 bases y 228 bases, respectivamente (Vilcek *et al.*, 1997).

En la poliproteína las proteínas se disponen en el siguiente orden: Npro/ C/ Ems/ E1/ E2/ p7/ NS2-3/ NS4A/ NS4B/ NS5A/ NS5B. La primera proteína Npro, es una proteasa no estructural propia de los pestivirus, con actividad autocatalítica; C

es la proteína de la nucleocápside, que le confiere una conformación de simetría icosaédrica al virión; Ems, E1 y E2 son las tres glicoproteínas de la envoltura (Thiel *et al.*, 1996). El resto de las proteínas, que corresponden a los dos tercios del genoma codificante, son no estructurales y tienen diferentes actividades. La primera proteína sintetizada corresponde a NS2-3, la cual en algunas cepas de pestivirus es cortada dando lugar a las proteínas NS2 y NS3 (Collet *et al.*, 1988), lo cual se utiliza como indicador de citopatogenicidad para el VDVB. La proteína NS2 ha sido descrita recientemente como una cisteína proteasa (Lindenbach *et al.*, 2007). Aparentemente, la proteína NS3 tendría actividad de serina proteasa (Méndez *et al.*, 1998), NTPasa y helicasa (Grassmann *et al.*, 1999). Luego de NS2-3, están las proteínas no estructurales NS4 y NS5, las que son procesadas generando NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Se desconoce la función de estas proteínas, y se postula que NS5B sería la polimerasa ARN-dependiente del virus (Lindenbach *et al.*, 2007). En relación al crecimiento en cultivos celulares, los pestivirus se caracterizan por crecer a bajos títulos, con baja eficiencia de liberación desde las células infectadas y con tendencia a unirse a restos celulares. Los virus libres son frágiles y tienden también a asociarse con componentes del suero, lo cual dificulta su purificación y posterior observación por microscopía electrónica (Thiel *et al.*, 1996).

Otra propiedad que caracteriza a los pestivirus es la existencia de dos biotipos, reconocidos por los cambios morfológicos que inducen en los cultivos celulares posterior a su inoculación. El biotipo no citopatogénico (NCP) está representado por los virus que replican sin producir efecto citopático en las células y son predominantes en la naturaleza; en cambio el biotipo citopatogénico (CP), corresponde a aquellos que producen destrucción de las células infectadas, son poco frecuentes y generalmente se encuentran asociados a brotes de la enfermedad de las mucosas (Thiel *et al.*, 1996). La citopatología *in vitro* no está correlacionada con la virulencia *in vivo*.

2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS PESTIVIRUS

Como los pestivirus son responsables de diversas enfermedades en su hospedero natural, históricamente fueron divididos en tres especies, de acuerdo al animal de donde fueron aislados: virus peste porcina clásica (VPPC) de porcinos, virus enfermedad de la frontera (VEF) de ovejas y VDVB de bovinos. Sin embargo, estos virus, además de compartir algunos antígenos (Horzinek, 1973) no son completamente especie-específicos y son muchos los reportes de transmisión cruzada entre especies, tanto en estudios experimentales como de campo.

Con el desarrollo de técnicas más eficientes, como la neutralización cruzada, el uso de anticuerpos monoclonales virus-específico, y últimamente, el análisis genómico de los aislados, que se basa en la comparación de regiones altamente conservadas del genoma, como la región 5'-UTR; o de otras altamente variables como la región que codifica para la glicoproteína E2, ha permitido tipificar genómicamente aislados y confirmar que los pestivirus no son estrictamente especie-específicos, por lo que la terminología clásica, basada en la especie hospedera, se sustituye por una nueva nomenclatura basada en la similitud viral mostrada por la comparación de secuencias génicas (Becher *et al.*, 1995; Paton *et al.*, 1995; Vilcek *et al.*, 1997). De acuerdo a esto, se establecen las especies VDVB genotipo 1 (VDVB-1) que agrupa a las cepas más clásicas no hipervirulentas de VDVB, VDVB genotipo 2 (VDVB-2) que incluye todos los aislados de Norteamérica de brotes hipervirulentos, más algunas cepas de baja o moderada virulencia, VEF y VPPC, sin embargo, el surgimiento de aislados que se ubican en linajes genómicos altamente divergentes ha llevado a presentar una nueva propuesta para la clasificación de los pestivirus que agrega a las especies anteriores cinco nuevas: VDVB-3 (un pestivirus atípico), Pestivirus de jirafa, Tunisian sheep virus (TSV), Antilope y Bungowannah (Liu *et al.*, 2009). El análisis filogenético también ha permitido diferenciar subgrupos dentro de las dos especies de VDVB. En una primera clasificación se determinaron dos subgrupos: 1a y 1b (Pellerin *et al.*, 1994). Posteriores análisis de la región 5'UTR y en N^{pro} de diferentes aislados determinaron que existen al menos 11 subgrupos de VDVB-1: 1a hasta el 1k (Vilcek *et al.*, 2001). En aislados de Francia se identificó el VDVB-11

y 1m (Jackova *et al.*, 2008) y en Japón los subgrupos VDVB-1n y VDVB-1o (Nagai *et al.*, 2008). En China se analizaron 8 muestras de ganado bovino y 4 de ellas formaban un grupo aparte que parecía ser un nuevo subgrupo, que se ha escrito tentativamente como "VDVB-1p" (Xue *et al.*, 2010) completando así 16 subgrupos. Respecto a VDVB-2 se han determinado los subgrupos VDVB-2a y VDVB-2b) (Flores *et al.*, 2002).

2.3. EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB)

El VDVB descrito como de distribución mundial con prevalencias serológicas en el ganado bovino que sobrepasan el 60%, es un concepto en estado de transición, puesto que, el conocimiento de la importancia de esta enfermedad ha llevado a varios países a establecer programas para controlar la infección en bovinos, en particular los países escandinavos parecen estar cerca de la erradicación (Ridpath, 2010). Además, en el año 2007 la Oficina Internacional de Epizootias añadió el VDVB a la lista de enfermedades reportables como afección del bovino, pero no son reportables la enfermedad en las otras especies, lo que genera una confusión dado que el VDVB también se multiplica y produce enfermedades reproductivas en especies domésticas como cerdo, ovejas, cabras y varias especies silvestres (Ridpath, 2010).

2.4. COMPLEJO DIARREA VIRAL BOVINA / ENFERMEDAD MUCOSA (DVB/EM)

El VDVB es el agente causal del complejo diarrea viral bovina/enfermedad de las mucosas (DVB/EM). La DVB fue diagnosticada por primera vez en Nueva York, Estados Unidos, en el año 1946 como una enfermedad transmisible en bovinos caracterizada por fiebre, depresión, diarrea, anorexia, leucopenia erosiones gastrointestinales y hemorragias (Olafson *et al.*, 1946). El agente causal se aisló en 1957 y se llamó VDVB (Lee y Gillespie, 1957). Posteriormente, en Canadá, Alemania y el Reino Unido, se presentó una enfermedad similar, pero más severa, que afectaba a unos pocos animales del rebaño provocando alta

mortalidad y que no pudo ser transmitida experimentalmente, que se llamó enfermedad mucosa, (Ramsey y Chivers,1953).

La presentación clínica de la DVB varía dependiendo del genotipo y subgrupo de virus, especie hospedadora e infecciones concurrentes con otros patógenos. Además, de producir diarrea, las presentaciones clínicas más comunes se asocian con enfermedades respiratorias y de la reproducción.

La principal ruta de infección postnatal es la oronasal. La transmisión puede ser directa o indirecta por la ingestión de saliva, descargas óculonasales, orina y heces contaminadas (Baker, 1987).

Las infecciones postnatales de animales inmunocompetentes, en un 70-90% de los casos son subclínicas (Ames, 1986), con un leve aumento de la temperatura corporal y leucopenia, que es seguida por el desarrollo de anticuerpos neutralizantes específicos. En otros casos, se genera el cuadro de diarrea viral bovina, donde los animales presentan: diarrea, depresión, anorexia, descarga óculonasal y ocasionalmente lesiones orales caracterizadas por úlceras poco profundas. Esta enfermedad es de alta morbilidad pero de baja letalidad en los predios infectados (Baker, 1987).

La infección con VDVB provoca inmunodepresión en los animales, por lo que predispone a otras enfermedades infecciosas tanto virales como bacterianas (Potgieter *et al.*, 1984; Ames, 1986; Baker, 1987).

Si la infección se produce en una hembra gestante, la consecuencia depende de la etapa del periodo de la gestación en que se encuentre. Aunque los abortos y nacimiento de crías débiles son a consecuencia de infecciones en el último periodo de la gestación, las infecciones en etapas tempranas tienen gran impacto en la reproducción, así, si ocurre entre los 45 y 125 días de gestación, puede haber reabsorción fetal, momificación, aborto, malformaciones congénitas o el establecimiento de animales persistentemente infectados (PI). Los animales PI, son inmunotolerantes para el virus que los está infectando y se comportan como fuente continua de eliminación del virus al medio ambiente, transformándose en la principal fuente de diseminación viral. Estos animales PI con una cepa NCP del virus, son los que pueden desarrollar el cuadro de EM, cuando el virus sufre

mutaciones puntuales dentro del gen NS2 o recombinaciones genéticas transformándose en CP (Kümmerer *et al.*, 2000) o si se sobre infectan con una cepa VDVB CP antigénicamente homóloga a la que está presente en el animal (Baker, 1987).

Clínicamente, el cuadro de EM se caracteriza por presentar fiebre, depresión, debilidad, anorexia, diarrea profusa, descarga nasal mucopurulenta y lagrimeo en algunos casos; el resultado siempre es la muerte de los animales. Al examinar la cavidad oral se observan lesiones erosivas en toda la mucosa bucal y de la lengua, con grandes áreas de necrosis. Exámenes *post mortem* muestran que las erosiones se extienden a toda la mucosa del tracto gastrointestinal (Baker, 1987).

La EM de tipo crónica, se produce en un animal PI que presenta una cepa CP antigénicamente muy similar, pero no idéntica a la cepa NCP presente en él. Estos casos crónicos cursan por varias semanas o meses, en los cuales los animales presentan inapetencia, pérdida de peso y emaciación progresiva con diarrea continua y finalmente mueren (Baker, 1990).

Existe una forma hipervirulenta del VDVB, que apareció en Norteamérica en la década de los '80. Esta forma clínica afecta a animales de todas las edades, con altas mortalidades principalmente de los terneros, pero también en adultos (Rebhun *et al.*, 1989). Los signos clínicos comprenden una trombocitopenia severa con hemorragias extensivas (Corapi *et al.*, 1989), o problemas respiratorios severos (Carman *et al.*, 1998; Odeon *et al.*, 1999). Todos estos aislados hipervirulentos se identifican como VDVB-2.

2.5. ENFERMEDAD DE LA FRONTERA (EF)

La EF se describió por primera vez en 1959 en una región fronteriza de Inglaterra y Gales (Hughes *et al.*, 1959). Se define como una afección neurológica de los corderos recién nacidos, caracterizada por temblores musculares, malformaciones esqueléticas, retardo del crecimiento y un vellón anormal con características de pelo. Sin embargo, la infección por este virus se asocia también

a un síndrome caracterizado por la presentación de abortos y mortinatos (Nettleton, 1990).

El hospedero natural es la oveja, pero las cabras también pueden ser infectadas (Loken *et al.*, 1982). Las infecciones por este virus, tanto en ovejas como en cabras, asemejan en muchos aspectos a aquellas producidas por VDVB en el bovino, en especial en el hecho de que el mayor problema está dado por las infecciones congénitas y el nacimiento de individuos PI, los cuales son la fuente más importante de infección dentro de un rebaño. Estos animales se caracterizan por no presentar signos de enfermedad, ser virémicos y excretar el virus continuamente por la vía respiratoria, digestiva y urinaria (Terpstra, 1981).

Los animales susceptibles son infectados por contacto directo, siendo la orofaringe la principal ruta de infección. La transmisión mecánica por inyecciones parenterales también es posible, notificándose brotes de la enfermedad después de la vacunación de hembras gestantes con vacunas contaminadas con pestivirus (Loken *et al.*, 1991).

Las infecciones postnatales agudas de corderos y la de animales adultos, provocan un cuadro clínico inaparente o algunas veces con depresión pasajera, fiebre y leucopenia. Los animales afectados desarrollan una respuesta inmune eficiente y después de alrededor de 2 semanas de la aparición de anticuerpos neutralizantes, se termina el periodo virémico y se elimina el virus (Nettleton, 1990). Sin embargo, se ha descrito un cuadro de leucopenia severa con una mortalidad del 50% de los corderos de 3-5 meses de edad, provocado por un aislado inusualmente patógeno del VEF. Este cuadro se describió en 1983 en la región de Aveyron en Francia, por lo que recibió el nombre de enfermedad de Aveyron (también llamado síndrome "X" o enterocolitis leucopénica ovina), y los principales signos clínicos fueron: depresión severa, fiebre y diarrea. El examen *post-mortem* reveló hemorragias, principalmente, en el ciego, colon y nódulos linfáticos mesentéricos (Nettleton, 1990).

Cuando la infección aguda se produce en hembras gestantes, el VEF cruza la placenta e infecta al feto. La infección del útero causa placentitis, y en las cabras se asocia con una alta incidencia de muertes fetales y abortos (Barlow *et*

al., 1975). En la oveja, la infección transplacentaria durante la preñez temprana, puede resultar en muerte fetal y abortos. En forma alternativa, los contagios intrauterinos durante la primera mitad de la gestación pueden provocar el nacimiento de corderos con temblores musculares, ataxia, anormalidades del vellón, malformaciones cerebrales y bajo crecimiento. Al nacimiento, estos corderos clínicamente afectados, tienen pocas probabilidades de sobrevivir muriendo mucho más tempranamente; mientras que los que sobreviven tienen una baja tasa de crecimiento y son más susceptibles a otras enfermedades. También en este periodo, pueden nacer corderos PI con algunas manifestaciones clínicas o normales (Nettleton, 1990).

La infección en la segunda mitad de la gestación lleva a que los fetos produzcan anticuerpos y elimine el virus siendo, en este periodo, rara la mortalidad de los corderos, con el consecuente nacimiento de corderos normales. Esta respuesta a antígenos se desarrolla aproximadamente entre los 60 a 80 días de gestación (Nettleton, 1990).

El cuadro nervioso que presentan los corderos con EF, es explicado por la alteración que provoca este virus en la diferenciación de los oligodendrocitos, fenómeno que interrumpe la mielinización de los axones, generando una hipomielinización en un periodo crítico del desarrollo (Barlow y Storey, 1997). El estudio de los cambios neuroquímicos de las lesiones en el sistema nervioso central, describen una degeneración de la mielina dado por su composición química anormal, fenómeno que coexistiría con la hipomielinización en estos corderos (Patterson *et al.*, 1975).

Las anormalidades en la piel y el vellón, es el resultado del aumento de los folículos primarios, del tamaño de la fibra y del número de fibras primarias meduladas (Orr, 1982). Esta cubierta de tipo piloso crece sobre el vellón normal formando una especie de halo alrededor del cuello y el dorso (Nettleton, 1990).

Al igual que para el VDVB, la enfermedad congénita y la infección persistente en las ovejas son causadas por biotipos NCP del VEF, sin embargo, se cuenta con aislados CP obtenidas de ovejas muertas por un síndrome semejante al de EM (Barlow *et al.*, 1983). El estudio molecular de dos aislados CP y NCP

ovinos sugiere que, al igual que en el complejo VDVB/EM, las cepas CP se originan a partir de virus NCP (Becher *et al.*, 1996).

Infecciones naturales y experimentales de ovejas con pestivirus bovino y ovino, indican que la biología de la infección con estos virus en hembras gestantes es similar en estas especies. La infección de ovejas gestantes con VDVB, reproduce en la oveja signología similar a la que se produce en la vaca, así como la provocada cuando la infección es por VEF (Parsonson *et al.*, 1979; Nettleton *et al.*, 1992).

2.6 INFECCIÓN POR PESTIVIRUS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

La infección de CS con pestivirus se debería, mayoritariamente, a infecciones con VDVB y el candidato de transmisión más probable sería el ganado bovino (Evermann, 2006). Sin embargo, la importancia del ganado bovino como fuente de infección con VDVB para los CS aún no es clara, puesto que, se ha confirmado un brote de DVB en un rebaño de alpaca, sin contacto con bovinos ni ovinos, al este de Ontario (Carman *et al.*, 2005) y en Estados Unidos a pesar que el VDVB está ampliamente diseminado en el ganado bovino, la ocurrencia de casos en CS se presenta solo en algunas áreas geográficas (van Amstel y Kennedy, 2010).

La infección con el VDVB en CS puede generar varios síndromes; se describe una signología pasajera con anorexia parcial, letargia moderada y subsecuente ruptura del vellón (Carman *et al.*, 2005). Otro tipo de presentación es de tipo agudo que puede ser producto de la introducción de un animal PI en el rebaño. En hembras en periodo reproductivo puede producirse pérdida de preñez temprana, aborto y nacimientos prematuros (Goyal *et al.*, 2002; Wentz *et al.*, 2003; Carman *et al.*, 2005; Mattson *et al.*, 2006) y uno de los mayores problemas de la infección por VDVB durante la preñez, es el establecimiento de inmunotolerancia del feto vía infección congénita que conduce a la formación de crías PI. Las crías PI pueden manifestar anemia, bajos niveles de hemoglobina en la sangre y leucopenia (Mattson *et al.*, 2006). Se describe rebaños con alpacas PI en Norteamérica, Europa (Carman *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2005; Mattson *et al.*,

2006; Foster *et al.*; 2007; Byers *et al.*, 2009) y en Chile (Arce, 2001). La presentación crónica de la enfermedad es la más descrita con signos de crecimiento retardado, baja ganancia de peso, diarrea crónica, inflamación de articulaciones y episodios de descarga nasal y neumonías resistentes al tratamiento con antibióticos (Goyal *et al.*, 2002; Wentz *et al.*, 2003; Carman *et al.*, 2005; Mattson *et al.*, 2006; Foster *et al.*; 2007). Los signos de la enfermedad crónica pueden presentarse a los pocos meses de edad y generalmente se llega a la eutanasia o muerte natural del animal a edad temprana (Goyal *et al.*, 2002; Carman *et al.*, 2005; Mattson *et al.*, 2006).

Las lesiones a la necropsia incluyen emaciación, córneas opacas, edema pulmonar, efusión de fluidos en las cavidades del cuerpo, linfadenopatía mesentérica, contenido intestinal líquido y trazas de fibrina en el saco pericardial (Belknap *et al.*, 2000; Mattson *et al.*, 2006; Foster *et al.*; 2007). El examen microscópico de tejidos de un animal PI mostró necrosis ocasional de células Infoides en la retina del ojo y posible lisis de neuronas en secciones del cerebro. La inmunohistoquímica reveló antígenos virales en diferentes tejidos como estómago, riñón, glándula tiroide, epitelio de la boca (Carman *et al.*, 2005).

El análisis filogenético de aislados obtenidos de CS en diferentes estudios, demuestran que sólo se ha obtenido VDVB-1b (Carman *et al.*, 2005; Mattson *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2007). Así mismo, en un estudio que involucró más de 12.000 alpacas se obtuvo 46 aislados provenientes de animales PI, o animales en contacto con PI, resultando todos los aislados de genotipo 1b (Kim *et al.*, 2009). El VDVB-2 no se ha identificado en CS, el único reporte de aislamiento de VDVB-2 CP fue obtenido de un dromedario con signos de enfermedad reproductiva y congénita (van Amstel y Kennedy, 2010)

2.7. DIAGNÓSTICO

Debido al amplio espectro de signos clínicos que pueden observarse producto de la infección con VDVB, el diagnóstico requiere de la confirmación del laboratorio. Las pruebas mayormente empleadas para identificar la presencia del virus en el animal se basan en la detección de antígenos y en la detección de

genomas en los tejidos infectados. La detección de antígenos se puede efectuar mediante pruebas de inmunofluorescencia directa (IFD) e inmunohistoquímica. Las pruebas de ELISA (del inglés “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”), de mucho uso en el ganado bovino no ha sido validado para CS (van Amstel y Kennedy, 2010). Para la detección de genoma se emplea la transcripción inversa de una porción del ARN viral seguida de una amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), al respecto, el PCR anidado en tiempo real es el más recomendado por su alta sensibilidad y además no es inhibido por la presencia de anticuerpos preexistentes como ocurre con ELISA y el aislamiento viral, sin embargo, el aislamiento del virus sigue siendo la prueba “estándar de oro” en el diagnóstico (WADDL 2006) y para ello se emplean cultivos celulares primarios de riñón, músculo y testículo fetal bovino o líneas celulares como la PK-15 (línea celular de riñón porcino) y MDBK (línea celular de riñón bovino) (Hussin y Woldehiwet, 1994). En todos los casos de aislamiento viral, se debe confirmar que tanto las células como el suero empleado como factor de crecimiento de las células, se encuentren libres de pestivirus (Edwards, 1990). La identificación del agente aislado se logra por las mismas pruebas, señaladas, anteriormente, para el diagnóstico viral en los tejidos del animal.

Cualquiera sea el procedimiento de diagnóstico, frente a un resultado positivo en un animal vivo, se debe tener presente que puede tratarse de una primoinfección o de un PI, para lo cual lo recomendado es repetir la prueba tres a cuatro semanas de la infección aguda, sin embargo, el “Washington Animal Disease Diagnostic Laboratory” (WADDL, 2006) señala que infecciones agudas pueden dar resultados positivos por sobre 60 días. La confirmación de positividad en las dos muestras, en ausencia o bajos títulos de anticuerpos, confirma que se trata de un animal PI.

Para caracterizar genéticamente los aislados de pestivirus es factible emplear la secuenciación de ácidos nucleicos de una región amplificada del genoma viral o usar de enzimas de restricción (ER). Este procedimiento se basa, en la existencia o no de sitios de corte en el genoma viral, reconocidos por algunas ER específicas para determinados pestivirus. Es así como, la enzima *Bgl I*

digiere fragmentos de ARN de VPPC, pero no así de VDVB y VEB (Vilcek *et al.*, 1994). Por otro lado, las enzimas de restricción *Xho I* y *Pst I* permiten distinguir los genotipos VDVB-1 y VDVB-2 al utilizarse sobre aislados de VDVB. Los amplicones obtenidos de la región 5'UTR de todos los VDVB-1, presentan un sitio de corte para la enzima *Pst I*; no así los obtenidos a partir de los aislados pertenecientes al VDVB-2, además, la enzima *Xho I* es capaz de digerir la región 5'UTR de todos los VDVB. Todos estos antecedentes permiten concluir que aquellos aislados que son digeridos por la enzima *Xho I* y la enzima *Pst I* pertenecen al VDVB-1 y los aislados que sólo son digeridos por la enzima *Xho I*, pertenecen al VDVB-2 (Harpin *et al.*, 1995; Shimazaki *et al.*, 1998).

El diagnóstico serológico por prueba de seroneutralización, indica exposición al virus y no una infección activa. Solo un incremento entre cuatro a seis veces en los títulos de anticuerpos entre la fase aguda y la convalecencia dan cuenta de una infección reciente por pestivirus (WADDL, 2006). Los títulos reportados posteriores a infecciones naturales fluctúan entre 20 a 480.

2.8 SITUACIÓN EN CHILE

En Chile, se describen antecedentes anatomopatológicos que hacían sospechar de la presentación de la enfermedad, en los bovinos, desde el año 1983 (Fiedler *et al.*, 1986). Sin embargo, el VDVB fue aislado por primera vez en el año 1985, desde un rebaño bovino que sufrió el cuadro de EM en la Región de Los Lagos (Reinhardt *et al.*, 1986). Desde entonces, prospecciones serológicas para el VDVB muestran que aproximadamente el 60% de los bovinos de leche y el 80% de los bovinos de carne de la Región Metropolitana (Celedón *et al.*, 1996; Celedón *et al.*, 1997a), así como el 70% de los bovinos de las Regiones de La Araucanía y de Los Lagos se han infectado con este virus (Reinhardt *et al.*, 1990).

Posteriormente, el VDVB se ha aislado en reiteradas ocasiones desde fetos abortados, animales muertos, vacas con antecedentes de aborto y síndrome de vaca repetidora y de animales clínicamente sanos. Por medio de aislamiento viral y pruebas de seroneutralización se ha demostrado la presencia de bovinos PI (Celedón *et al.*, 1998). También se ha aislado desde ovejas y cabras de apariencia

clínica sana (Müller, 2003). Informaciones entregadas por médicos veterinarios y ovejeros dan cuenta de la presencia de signos clínicos similares a los descritos para la enfermedad, a la vez que se describe presencia de animales serológicamente positivos al VEF (Tadich *et al.*, 1998). En rebaños de alpacas y llamas de la Región Metropolitana se han constatado animales serológicamente positivos (Celedón *et al.*, 2001) y se han aislado pestivirus desde guanacos aparentemente sanos y de alpacas, y llamas sanas y enfermas ubicadas en la Región Metropolitana, constatándose la presencia de alpacas PI en un rebaño donde se produjo un brote de abortos (Arce, 2001), pero se desconoce si los aislados corresponden a VDVB-1, VDVB-2, VEF o a algún virus propio de las especies de camélidos sudamericanos.

En esta memoria de título se aíslan e identifican genómicamente pestivirus obtenidos de alpacas, llamas y guanacos presentes en la Región Metropolitana.

HIPÓTESIS

Alpacas, llamas y guanacos de cinco rebaños de la Región Metropolitana de Chile se encuentran infectados con pestivirus.

OBJETIVO GENERAL

Confirmar la presencia de infecciones por pestivirus en Camélidos Sudamericanos de Chile,

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar pestivirus de muestras obtenidas de alpacas, llamas y guanacos sospechosas de estar infectadas con pestivirus.
- Identificar la especie viral y el genotipo de los aislados de pestivirus obtenidos de alpacas, llamas y guanacos.

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS

Las muestras fueron obtenidas de 79 CS sospechosos de estar infectados con pestivirus, para lo cual, se eligieron animales con antecedentes clínicos atribuibles a la acción de pestivirus como muerte sin causa definida, feto abortado, hembra con aborto y animales pertenecientes a rebaños donde se hubiesen presentado síndromes clínicos atribuidos a infección por pestivirus y que existieran animales con anticuerpos para pestivirus o contacto con bovinos, ovinos o caprinos. Las muestras de alpacas y llamas provinieron de animales entre cuatro y diez años, ubicados en cuatro rebaños (A, B, C y D) de cuatro comunas de la Región Metropolitana. En el rebaño A todos los animales del rebaño tenían apariencia de estar clínicamente sanos y se tenía el antecedente de la existencia de una alpaca y una oveja con anticuerpos para pestivirus y de la presencia de bovinos, ovinos y caprinos en corrales vecinos con separación no mayor a tres metros. El rebaño B estaba conformado por 200 alpacas, llamas y algunas ovejas y se tenía el antecedente que en un periodo de nueve meses había ocurrido un episodio de enfermedad respiratoria, digestiva y abortos; de 41 hembras preñadas 26 abortaron, murieron ocho y murió una hembra que parió un mortinato (Miranda, 2000); por análisis serológico, de 32 hembras sobrevivientes, en siete se detectaron anticuerpos para pestivirus (Celedón *et al.*, 2001), además, en el mismo rebaño se detectaron animales PI (Arce, 2001). El rebaño C constituido por 45 llamas, en un periodo de cuatro meses algunas presentaron fiebre, seis abortaron y cinco murieron; a la necropsia los intestinos estaban enrojecidos; no se detectaron animales seroreaccionantes a pestivirus. En el rebaño D, tres de 11 llamas presentaron anticuerpos para pestivirus (Celedón *et al* 2001) y dos se encontraron muertas sin antecedentes previos de estar enfermas. Las muestras de guanaco pertenecientes al rebaño E correspondían a animales menores de un año, mantenidos en cautiverio en la Región Metropolitana con antecedentes de sufrir enfermedad respiratoria y muerte de animales (Cuadro 3).

En los animales vivos las muestras fueron de sangre, extraída por punción de la vena yugular, y en los muertos trozos de órganos.

Cuadro 3: Número de muestras por especie de camélidos sudamericanos según distribución y antecedentes del rebaño

Rebaños	Alpacas	Llamas	Guanacos	Total animales	Antecedentes del rebaño	Presencia de otros rumiantes
A	11	0	0	11	Animales seropositivos a VDVB	Bovinos, Ovinos, Caprinos
B	31	1	0	32	Animales seropositivos a VDVB, muertes de adultos, abortos, mortinatos, enfermedad respiratoria y digestiva, PI*	Ovinos
C	0	12	0	12	abortos	No se conoce
D	0	19	0	19	Animales seropositivos a VDVB, muerte en adulto y enfermedad respiratoria	Bovinos Ovinos Caprinos
E	0	0	5	5	Muerte y enfermedad respiratoria en menores de un año	No se conoce
TOTAL	42	32	5	79		

* persistentemente infectado con virus diarrea viral bovina

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre y de órganos fueron procesadas con la finalidad de obtener inóculos para aislamiento viral en cultivos celulares.

1. PROCESAMIENTO DE SANGRE PERIFÉRICA

La mayoría de las muestras de sangre se encontraban conservadas a -40° C y se obtuvieron sin anticoagulante, con la finalidad de obtener suero, para detectar la presencia de anticuerpos anti pestivirus (Celedón *et al.*, 2001). Se seleccionaron como inóculo las muestras seronegativas a VDVB. En algunos animales se tomaron sangre con y sin anticoagulante logrando obtenerse como inóculos: suero, leucocitos y plasma.

Para la obtención de suero, la sangre depositada en tubo, se dejó coagular manteniéndose por 24 horas a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos y se extrajo el suero, el cual se dispuso en volumen de 1ml en tubo Eppendorf® y se almacenó a -40° C.

Para la obtención de leucocitos y plasma, las muestras de sangre fueron tomadas en tubos con anticoagulante, las que se centrifugaron a 500 xg durante 10 minutos, para luego extraer el plasma y depositarlo en tubos Eppendorf®, siendo conservados a -40°C. A continuación, se extrajo la interfase entre plasma y glóbulos rojos la cual contiene las células blancas, que son separadas de los eritrocitos contaminantes mediante fraccionamiento, para lo cual, el paquete celular se suspendió en 1 ml de solución tampón fosfato 0,01 M, pH 7,2 (PBS 7,2), y se depositó sobre una columna de 2 ml de Ficoll Hipaque® (densidad 1,077) que se centrifugó a 700 xg durante 30 minutos. Posteriormente, los leucocitos recuperados se lavaron tres veces con PBS 7,2 centrifugando a 500 xg por 5 minutos entre cada lavado. Finalmente, el paquete de leucocitos se suspendió en 500 ul de PBS 7,2 y se conservó a -40°C (Edwards, 1990).

2. PROCESAMIENTO DE ÓRGANOS

En animales muertos los inóculos se prepararon, de trozos de órganos como hígado, bazo, pulmón, riñón y nódulos linfoides. Cada tejido, fue lavado con tampón PBS 7,2 suplementado con 200 UI de penicilina y 200 ug de estreptomycin por ml de solución. Posteriormente, el tejido fue fragmentado con tijera y se homogenizó en un mortero, facilitando el proceso mediante el uso de

arena. El homogenizado se suspendió en 5 ml de PBS 7,2 con antibióticos y se centrifugó a 700 xg por 10 minutos, el sobrenadante constituyó el inóculo, el que fue conservado en volumen de 1 ml en tubos Eppendorf ® a -40°C.

PREPARACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron cultivos celulares, generados a partir de células de pulmón bovino fetal obtenido de la planta faenadora de carnes de la Empresa Agrícola e Industrial Lo Valledor S.A. Las células probadas de estar libres de contaminación bacteriana y de VDVB que se encontraban congeladas a -196° C en su segundo pasaje, fueron descongeladas y crecidas en botellas de cultivos celulares (Corning®) de 75 cm², en Medio Esencial Mínimo Eagle (GIBCO BRL, Cat. N° 41500-067) adicionado de tampón HEPES 5,95 gr/l (GIBCO BRL, Cat. N°11344-041), 1 mM de piruvato de sodio (GIBCO BRL Cat. N° 11360-070), 1,5 gr/l de bicarbonato de sodio, 100 UI penicilina, 100 ug de estreptomicina y 2,5 ug de fungizona por ml de medio de cultivo (MEM). Como factor de crecimiento celular se adicionó suero equino probado de estar libre de VDVB (HyClone Cat. N° SH 3007403) al 10%, el que fue rebajado a un 2% en el MEM de mantención.

Este cultivo celular, que constituyó el tercer pasaje celular, se incubó a 37° C por 5 días con observaciones microscópicas diarias. Al quinto día se realizó el cuarto pasaje de las células procediendo de la siguiente forma: se retiró el medio de cultivo sobrenadante, la monocapa celular se lavó con 10 ml de salina A de Puck (Puck *et al.*, 1961) a 37° C y luego se adicionó 3 ml de tripsina verseno (tripsina 1:250 en concentración de 0,05% y verseno en concentración de 0,02% en salina A de Puck, ajustada a pH 7,6) a 37° C y se incubó por 5 minutos a 37° C permitiendo el desprendimiento y disgregación de la monocapa celular, la que fue adicionada de salina A en volumen de 20 ml y se centrifugó a 700 xg por 10 minutos. El paquete de células se llevó a una concentración de 80.000 células por ml de MEM adicionado de un 10% de suero equino y se sembró en botellas incubándose por 5 días a 37° C. El quinto pasaje celular se realizó de igual forma, pero esta vez la suspensión celular se dispuso en tubos en cantidad de 200.000 células en 2 ml de MEM suplementado con un 10% de suero equino (medio de

crecimiento), para obtener monocapas celulares a las 24 horas de incubación a 37° C.

AISLAMIENTO VIRAL

En el procedimiento de aislamiento viral, los inóculos se descongelaron e inocularon en volúmenes de 100 ul sobre la monocapa de células, incubándose durante 60 minutos en estufa a 37° C. Posteriormente, se adicionó MEM suplementado con 2% de suero equino, para seguir incubando durante 5 días en estufa a 37° C con observación microscópica diaria para controlar viabilidad celular, toxicidad de las muestras, efecto citopático, contaminación bacteriana o fúngica y desprendimiento celular. Una vez finalizado este periodo, los cultivos celulares se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación (-40° C y 37° C) a modo de lizar las células y liberar el posible virus de ubicación intracelular. Las suspensiones obtenidas fueron re-inoculadas en nuevas monocapas celulares, repitiéndose el proceso antes señalado por 4 veces.

El quinto pasaje de cada inóculo se hizo sembrando 100 ul del inóculo del cuarto pasaje en una monocapa de células cultivadas, por un periodo de 24 horas, sobre una laminilla de vidrio de aproximadamente 1cm² dispuesta en un tubo Leighton, procediéndose de manera similar a los pasajes anteriores, pero una vez finalizado el periodo de incubación a 37° C, en este caso de tres días, se retiraron las laminillas del tubo Leighton y la monocapa celular se lavó sumergiéndola por cinco minutos en PBS 0,01M pH 7,6 (PBS 7,6) y posteriormente se fijó al vidrio sumergiéndola en acetona (Merck) enfriada a -20° C por 10 minutos. Las laminillas, una vez evaporada la acetona, se conservaron a -40° C hasta el momento de identificar antigénicamente los aislados virales mediante prueba de inmunofluorescencia directa (IFD). Paralelamente, se inocularon 50 ul, empleándose cuatro pocillos por cada muestra en estudio, en microplacas de 96 pocillos (Linbro® Cat. N° 76-002-05) que contenían monocapas celulares constituidas por 10.000 células, aproximadamente. En este caso al tercer día de sembrado el inóculo del quinto pasaje la monocapa celular se lavó por adición y

sustracción de 100 ul de PBS 7,6 y, posteriormente, las células se fijaron al plástico adicionando 50ul de acetona (Merck®) enfriada a -20° C y diluida 1:20 en PBS 7,6 por cinco minutos. Las microplacas una vez secas, se conservaron a -40° C hasta el momento de identificar antigénicamente los aislados virales mediante prueba de inmuno peroxidasa indirecta (IPI).

PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD)

La prueba de IFD se aplicó sobre las células cultivadas e infectadas en laminillas de los tubos Leighton. Al momento de realizar la prueba de IFD, las células se lavaron en PBS 7,6 durante 10 minutos, a continuación se agregaron 50 ul del conjugado policlonal específico para pestivirus (Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Cat. N° PA 0205-08), previamente titulado en una dilución de 1:30 adicionado con 0,01% de azul de Evans como contratinción y se dejó 30 minutos en cámara húmeda a 37° C. Terminada esta etapa las laminillas se lavaron tres veces sucesivas en PBS 7,6 y una vez en agua bidestilada durante cinco minutos cada uno y luego se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, sobre un portaobjeto desgrasado en alcohol-éter, se colocó una gota de glicerina tamponada al 50% en PBS 7,6 y sobre ella se depositó la laminilla, de manera que, el lado que tiene adherida la monocapa tome contacto con la glicerina (Bezek, *et al.*, 1988). La observación de la muestra se realizó en el microscopio de inmunofluorescencia marca Nikon (modelo HB-10101 AF) con aumento de 100 y 400X que se encuentra en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Se consideraron como positivas aquellas muestras que presentaron fluorescencia amarillo-verdosa en el citoplasma celular, y negativas cuando se observaron todas las células de color rojo. Paralelamente, se procesaron muestras controles positivos constituidos por cultivos celulares inoculados con un aislado no citopatogénico conocido y controles negativos constituidos por cultivos celulares sin inocular.

PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA (IPI)

La prueba de IPI se aplicó sobre las células cultivadas e infectadas en las microplacas. Al momento de realizar la prueba de IFD las células se lavaron con 50 ul de solución de lavado (PBS 7,6 adicionado de 0,22% de Tween 80 al 25%) por cinco minutos, a continuación se agregaron 50 ul, en una dilución 1:100, de una mezcla de cuatro anticuerpos monoclonales (ASC WB112 y ASC WB103 dirigidos contra la proteína NS 2,3 de la cepa Oregon C24V; ASC WB166 y ASC WB214 dirigidos contra la proteína E2 de la cepa NADL; Central Veterinary Laboratory, cat. RAE 2020) y se incubó por 15 minutos bajo una lámpara a 25° - 30° C; luego se lavó tres veces con solución de lavado por cinco minutos cada vez. La unión Ag-Ac se visualizó mediante la adición de 50 ul de un conjugado en dilución 1:100, compuesto por anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulina de ratón unido a una peroxidasa de rábano picante; se dejó incubar protegido de la luz durante 10 minutos a 25° - 30° C y se repitieron tres lavados, luego se agregaron 50 ul de un sustrato (diaminobencidina 0,06% más perborato de sodio 0,04% en PBS 7,6) sobre el cual actuó la peroxidasa en un tiempo de 20 minutos a 25° - 30° C (Saliki y Dubovi, 2004). La presencia de antígeno de pestivirus se apreció mediante la observación microscópica de gránulos de color marrón en el citoplasma celular que permite destacar claramente el núcleo celular no pigmentado. Paralelamente, se realizó el mismo procedimiento en células no inoculadas e inoculadas con VDVB a modo de control negativo y positivo, respectivamente.

Todos los aislados identificados como pestivirus fueron procesados para hacer la caracterización genómica.

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LOS AISLADOS DE PESTIVIRUS

Para la determinación genómica de los aislados fue necesario amplificar la cantidad de virus existente con el fin de realizar los procesos de extracción viral,

transcripción inversa, reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y digestión con enzimas de restricción que llevaron a determinar los distintos genotipos.

AMPLIFICACIÓN DE AISLADOS DE PESTIVIRUS

Todas las muestras que resultaron positivas a IFD y a IPI, fueron inoculadas en volumen de 300 μ l, en monocapas constituidas por 600.000 células de pulmón bovino fetal. Luego de un tiempo de adsorción de 60 minutos a 37° C, se adicionó seis ml de MEM de mantención y se incubó 72 horas a 37° C. Posteriormente, las células fueron lisadas por medio de tres ciclos sucesivos de congelación-descongelación. Los lisados obtenidos se conservaron en alícuotas a -60° C, hasta el momento de extraer el ARN viral.

EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

Para la extracción del ARN total de la suspensión de células infectadas con el VDVB se utilizó Trizol LS y ARN de levadura como coprecipitante del ARN viral, según instrucciones del fabricante (GIBCO-BRL, USA). A 750 μ l de Trizol LS se le adicionaron 250 μ l del lisado celular, se mezcló y se dejó cinco minutos a temperatura ambiente (en esta etapa se pudo detener el proceso y mantener a -70°C). Posteriormente, se agregaron 200 μ l de cloroformo y se agitó durante 15 segundos para incubarlo por cinco minutos a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo la mezcla se centrifugó por 15 minutos a 12.000 xg (Microcentrífuga Microspin 24s, Sorvall Instrument, USA). El sobrenadante se depositó en un tubo Eppendorf® para luego agregar 50 μ l de ARN levadura (1 mg/ml) y un volumen de isopropanol, logrando una mezcla que se agitó por 15 segundos y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente para luego centrifugar durante 10 minutos a 12.000 xg y eliminar el sobrenadante. El precipitado se lavó tres veces, cada lavado se hizo con un ml de etanol al 75%, agitando por 15 segundos y centrifugando a 7.500 xg durante cinco minutos entre cada lavado. A continuación, el precipitado se secó al vacío por 10 minutos, para luego resuspenderlo en 100 μ l de agua destilada libre de ADNasas y ARNasas e incubarlo a 55° C durante 10 minutos. Para finalizar, las muestras se guardaron a

-20° C, hasta el momento de realizar la PCR.

REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT)

Tanto la transcripción inversa del ARN como su amplificación por PCR se realizaron de acuerdo a las condiciones optimizadas en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

El partidor utilizado fue el 326, ubicado en la región 5' UTR del genoma viral. La posición de los partidores utilizados para la RT-PCR en el genoma de la cepa de referencia NADL del VDVB y el tamaño estimado del amplificado se encuentra en el cuadro 4 (Vilcek *et al.*, 1994).

Cuadro 4: Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados en la reacción RT-PCR, posición en genoma de NADL del VDVB y tamaño esperado de fragmento amplificado

Nombre de los partidores	Secuencia nucleotídica de los partidores	Posición de los partidores en el genoma de la cepa NADL	Tamaño esperado luego de RT-PCR
326	5'- TTCAACTCCATGTCCCATGTAG-3'	395-375	297 pb
P 99	5'-AGGCTAGCCATGCCCTTAGT-3'	99-118	

RT-PCR: transcripción inversa y amplificación por PCR del genoma viral.

NADL: National Animal Disease Laboratory.

pb: pares de bases.

La reacción de transcripción inversa se realizó en un volumen de 10 ul, bajo las siguientes condiciones; Tris HCl 20 mM; KCl 50 mM ("buffer" PCR 10X); ditiotreitól 5 mM; 10 pmoles de partidor 326; MgCl₂ 8 mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP 0,5 mM de cada uno; Thermoscript transcriptasa reversa (GIBCO-BRL); inhibidor de ribonucleasa Rnasa OUT (GIBCO-BRL) 1:10. Esta reacción se realizó por 45 minutos a 55°C y luego se incubó 5 minutos a 90°C para inactivar la enzima.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los requerimientos esenciales para esta prueba son: dos partidores sintéticos que son complementarios a las regiones opuestas de la zona que se amplifica, una secuencia blanco de ADN de la muestra, una ADN polimerasa termoestable y los cuatro desoxirribonucleótidos.

La zona que fue amplificada corresponde a una región no traducida del genoma viral (UTR) que es altamente conservada y común para todos los grupos del género pestivirus.

Una vez terminada la RT se realizó el PCR en un volumen de 25 uL, de acuerdo a las siguientes condiciones; Tris HCl 20 mM, KCl 50 mM ("buffer" PCR 10X); MgCl₂ 2 mM; ditiotreitól 2 mM; dATP; dCTP, dGTP, dTTP, 0,2 mM de cada uno; 2U de inhibidor de ribonucleasa Rnasa OUT (GIBCO-BRL); partidores 326 y P99 en cantidad de 10 pmoles cada uno; Taq polimerasa 2,5U (GIBCO) y 10 uL de la reacción de transcripción inversa. El PCR se realizó de acuerdo el siguiente programa: desnaturación inicial a 94° C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de alineación-elongación-denaturación del ADN a 55° C por 30 segundos, 72° C por 3 minutos y 94° C por 30 segundos. Para el último ciclo el tiempo de extensión fue de 10 minutos.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador con placa difusora de calor (PTC –100. MJ Research Inc).

ELECTROFORESIS DE LOS FRAGMENTOS DE ADN OBTENIDOS EN RT-PCR

Para visualizar el fragmento de ADN amplificado se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5% en tris borato EDTA (TBE) y posterior tinción con nitrato de plata. Para la electroforesis, a 2,5 ul de la mezcla de reacción obtenida en el PCR se le agregó 2,5 ul de "buffer" muestra (glicerol al 50% en TBE, azul de bromofenol (ABF) 0,025%), se mezclaron en la micropipeta y se cargó en el pocillo correspondiente del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 150 Volt por 1 hora. Una vez finalizada la migración en la electroforesis, el gel se fijó en una solución de etanol acético (solución fijadora) cuya composición es etanol 95% y ácido

acético 5% durante 20 minutos. Posteriormente, el gel fue teñido con nitrato de plata 0,18% dejándolo 20 minutos y luego se lavó dos veces con agua desionizada para después revelar con formaldehído 0,37% mas hidróxido de sodio al 2,5% (Espejo y Escanilla, 1993).

El fragmento amplificado del ADN, de un tamaño esperado de 297 pb, se estimó por comparación con un marcador de peso molecular (GIBCO-BRL), que posee 19 fragmentos de ADN de un tamaño de 25 a 450 pb, con incrementos de 25 pb, más un fragmento de 500 pb.

DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS

Para determinar los genotipos de los aislados de pestivirus, se realizó el análisis de los fragmentos de ADN obtenidos de RT-PCR con las enzimas de restricción (ER) *Bgl I*, *Pst I* y *Xho I* (Vilcek *et al.*, 1994; Paton *et al.*, 1995). 2-4 ml de productos amplificados obtenidos después del RT-PCR usando los primer 326/P99 fueron digeridos por 5U de *Bgl I*, *Pst I* y *Xho I* en 20 ml de volumen final por 4 horas a 37° C.

ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE LA DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para visualizar los productos de la digestión, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en TBE, con posterior tinción con nitrato de plata, según lo descrito anteriormente (Espejo y Escanilla, 1993). Para ello 2,5 ul de la mezcla de reacción obtenida en la digestión se le agregó 2,5 ul de "buffer" muestra (glicerol al 50% en TBE, azul de bromofenol (ABF) 0,025%), se mezclaron en la micropipeta y se cargó en el pocillo correspondiente del gel. Para poder interpretar los resultados se tuvo presente en que especie y genotipo viral tienen la capacidad de actuar estas enzimas utilizadas en el estudio, basado en los sitios de corte de cada enzima (cuadro 5). *Bgl I* solo corta virus peste porcina clásica, *Pst I* corte VDVB y VEF, no corta VDVB tipo II, y por último *Xho I* corta PPC, VDVB y no corta VEF (Vilcek *et al.*, 1994; Paton *et al.*, 1995; Harpin *et al.*, 1995).

Cuadro 5: Patrones de digestión de las enzimas de restricción *Pst I*, *Bgl I*, y *Xho I* en una porción no traducida del genoma del virus peste porcina clásica (VPPC), virus diarrea viral bovina genotipo 1 (VDVB-1) virus diarrea viral bovina genotipo 2 (VDVB-2) y virus enfermedad de la frontera (VEF)

Enzima de restricción	Sitios de corte	Tamaños de los fragmentos obtenidos	VPPC	VDBV-1	VDVB-2	VEF
<i>Pst I</i>	5'.....CTGCA*G.....3' 3'.....G*ACGTC.....5'	233pb + 55pb	+	+	-	+
<i>Bgl I</i>	5'..GCCN4*NGGC....3' 3'..CGGN*N4CCG....5'	42pb+ 246pb	+	-	-	-
<i>Xho I</i>	5'.....C*TCGAG.....3' 3'.....GAGCT*C.....5'	117pb + 171pb	+	+	+	-

N=A o C o G o T

RESULTADOS

Se trabajó con una muestra de 79 CS distribuida en cinco rebaños (A, B, C, D y E) de la Región Metropolitana, sospechosos de estar infectados con pestivirus. Se aisló virus en 37 (47 %) de los animales, distribuidos en nueve de 11 alpacas clínicamente sanas del rebaño A; ocho de 31 alpacas del rebaño B, en este rebaño seis alpacas parieron crías a término y las alpacas A-286 y A-287 abortaron al sexto mes de gestación; ocho de 12 llamas del rebaño C, en este rebaño dos aislados provenían de hembras que habían abortado (LI-791 y LI794) y uno de un feto abortado (LI-797); ocho de 19 llamas del rebaño D, en este rebaño todos las llamas eran de apariencia normal pero un aislado se obtuvo de un caso de muerte súbita (LI-1064); y cuatro de cinco guanacos del rebaño E, en este rebaño las muestras se obtuvieron de guanacos que cursaban enfermedad respiratoria y de uno muerto a causa del cuadro clínico (G-519) (Cuadro 6 y 7). Todos los aislados fueron no citopatogénicos, al menos hasta el quinto pasaje en cultivo celular de pulmón bovino fetal.

Cuadro 6: Frecuencia de aislamientos de pestivirus de alpacas, llamas y guanacos según distribución en rebaños

Rebaños Aislamiento	Alpacas		Llamas		Guanacos		Total
	+	-	+	-	+	-	
A	9	2	0	0	0	0	11
B	8	23	0	1	0	0	32
C	0	0	8	4	0	0	12
D	0	0	8	11	0	0	19
E	0	0	0	0	4	1	5
TOTAL	17	25	16	16	4	1	79

En la detección de antígenos de pestivirus en las células infectadas con las muestras de suero, plasma, linfocitos y órganos de animales muertos, en la mayoría de los casos presentaron los mismos resultados cuando se aplicaron las pruebas de IFD e IPI. Solo las alpacas A-10, A-14, A-20, y A-21 del rebaño A y el guanaco G-1066 del rebaño E resultaron negativos a IFD en tanto que la alpaca A-415 del rebaño B, la muestra de pulmón de la llama LI-797 del rebaño C y la muestra de bazo del guanaco G-519 del rebaño E resultaron negativas a IPI. En los resultados positivos a ambas pruebas, en la prueba de IPI se observó una mayor cantidad de resultados con una mayor cantidad de células que demostraron la presencia de antígenos de pestivirus, 50 a 70% de las células del campo visual del microscopio (Cuadro 7). Cuando se analizó más de una muestra procedente de un animal como en el caso de las llamas LL-791, LI-794, LI-796, y LI-797 del rebaño C, LL-1064 del rebaño D y del guanaco G-519 del rebaño E, en general se detectó positividad por las dos pruebas en todas las muestras procedentes de un mismo animal con excepción de la LI-797 en que el pulmón resultó negativo a IPI y del guanaco G-519 en que el bazo resultó negativo a IPI (Cuadro 7).

En 36 (97 %) de las 37 aislados de pestivirus, se pudo amplificar por RT-PCR una sección de la región 5'UTR del genoma viral confirmando su identificación como pestivirus. De los 36 amplicones obtenidos, ninguno de los fragmentos de ADN fue digerido simultáneamente por las enzimas de restricción *Pst I*, *Bgl I*, y *Xho I*, lo que indica que los aislados no corresponden a VPPC. Seis fragmentos obtenidos de alpacas, fueron digeridos por las enzimas *Pst I* y *Xho I*,

lo que permite identificar a estos pestivirus como VDVB genotipo 1 (VDVB-1). Treinta fragmentos de ADN correspondientes aislados de pestivirus obtenidos de 11 alpacas y 15 llamas y cuatro guanacos fueron digeridos por la enzima *Xho I* y no fueron digeridos por las enzimas *Pst I*, lo que permite identificar a estos pestivirus como VDVB genotipo 2 (VDVB-2). En un aislado obtenido de feto de llama (LI-797) no se logró amplificar el genoma de manera eficiente para digerirlo con las enzimas de restricción, de tal modo que no fue posible identificar el genotipo del aislado (Cuadro 5). No se obtuvieron fragmentos de ADN digeridos exclusivamente por la enzima *Pst I*, señalando esto que ninguno de los aislados puede identificarse como VEF (Vilcek *et al.*, 1994; Paton *et al.*, 1995; Harpin *et al.*, 1995). Sin embargo, corresponde señalar que muestras de bovino que han sido digeridas por *Pst I*, al ser sometidas a una RT-PCR diferencial fueron clasificadas como VDVB-1j (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

Cuadro 7: Detección de antígenos de pestivirus por pruebas de inmunofluorescencia directa (IFD), inmunoperoxidasa indirecta (IPI) e identificación de genotipo de aislados de virus diarrea viral obtenidos de alpacas, llamas y guanacos según ubicación en rebaños

Rebaño	Identificación	Muestra	IFD	IPI	Genotipo
A	A-2 (sana)	Suero	+	+	VDVB-2
	A-7 (sana)	Suero	++	+++	VDVB-1
	A-10 (sana)	Suero	-	+++	VDVB-2
	A-11 (sana)	Suero	+	++	VDVB-2
	A-12 (sana)	Suero	+	++	VDVB-2
	A-14 (sana)	Suero	-	+++	VDVB-2
	A-20 (sana)	Suero	-	++	VDVB-2
	A-21 (sana)	Suero	-	++	VDVB-2
	A27 (sana)	Suero	+	++	VDVB-2
B	A-285 (parto)	Suero	+++	+++	VDVB-1
	A-286 (aborto)	Suero	+++	+++	VDVB-1
	A-288 (aborto)	Suero	+	+++	VDVB-1
	A-345 (parto)	Suero	+	+++	VDVB-1
	A-350 (parto)	Suero	+	+++	VDVB-1
	A-407 (parto)	Suero	+	+	VDVB-2
	A-408 (parto)	Suero	++	+	VDVB-2

	A-415 (parto)	Suero	+	-	VDVB-2
C	LI-791 (aborto)	Leucocitos	++	+++	VDVB-2
		plasma	++	+++	
		suero	++	+++	
	LI-794 (aborto)	suero	+++	++	VDVB-2
		leucocitos	ND	++	
		plasma	++	++	
	LI-796 (sana)	plasma	++	++	VDVB-2
		suero	+++	+++	
		leucocitos	ND	+	
	LI- 797 (feto)	Bazo	++	+++	ND
		Leucocitos	+++	++	
		Pulmón	++	-	
	LI-826 (sana)	suero	+++	+++	VDVB-2
	LI-827 (sana)	suero	+++	+++	VDVB-2
	LI-829 (sana)	suero	++	++	VDVB-2
LI-830 (sana)	suero	+++	+++	VDVB-2	
D	LI-620 (sana)	suero	+++	+	VDVB-2
	LI-621 (sana)	suero	+++	+	VDVB-2
	LI-622 (sana)	suero	+++	+	VDVB-2
	LI-623 (sana)	suero	++	+++	VDVB-2
	LI-624 (sana)	suero	ND	+++	VDVB-2
	LI-625 (sana)	suero	++	+++	VDVB-2
	LI-626 (sana)	suero	++	+++	VDVB-2
	LI-1064 (muerta)	Bazo	++	++	VDVB-2
		Nódulo linfoide	+++	+++	
		Pulmón	++++	+++	
E	G-1065 (ER)	Suero	++	++	VDVB-2
	G-1066 (ER)	Suero	-	+++	VDVB-2
	G-1068 (ER)	Suero	++	+++	VDVB-2
	G-519 (muerto)	Bazo	+++	-	
		Nódulo linfoide	+++	+++	VDVB-2
		Hígado	+++	+++	
		Pulmón	+++	+++	

A= alpaca; LL= llama; G= guanaco; ND=no determinado; ER=enfermedad respiratoria

Porcentajes de células con antígeno viral: ++ 10 a <50%; +++ 50 a 70%; ++++ >70%

DISCUSIÓN

Al aislar e identificar VDVB en CS naturalmente infectados, se confirma la infección por pestivirus en los CS de Chile, preliminarmente detectada a través de la identificación de animales con anticuerpos que neutralizan al VDVB (Celedón *et al.*, 2001).

El alto porcentaje de aislamientos (47%) se atribuye a que se realizó un muestreo dirigido a rebaños de CS donde se sospechaba de la participación del virus por la presencia de CS seroreaccionantes al VDVB, enfermos con una patología atribuible a pestivirus y en contacto con ganado bovino, ovino o caprino susceptible de estar infectado con pestivirus. Además, las muestras fueron obtenidas de animales serológicamente negativos al VDVB, aumentando la posibilidad de detectar una infección en fase de viremia y la presencia de portadores inmunotolerantes, además se realizaron cinco pasajes de la muestra en cultivos celulares en lugar de tres, que es lo recomendado por los estándares de aislamiento viral (OIE, 2008), haciendo, de este modo más sensible la técnica de aislamiento viral. Por otra parte, el haber detectado los 37 aislados de VDVB como no citopáticos es coincidente con lo descrito para este virus en la producción bovina nacional donde el total de aislados virales han sido del tipo no citopáticos (Celedón *et al.*, 1997b; Celedón *et al.*, 1998), así como también en el ganado bovino de otros países (Baker, 1987; Radostits y Littlejohns, 1988; Ridpath, 2003).

La presencia del virus en los cuatro rebaños de la Región Metropolitana seleccionados para el estudio, sumado al antecedente previo de ausencia de reaccionantes serológicos de animales en su ambiente natural (alpacas, llamas y vicuñas de la Región de Arica y Parinacota y guanacos de la Región de Magallanes y la Antártica Chilena) (Celedón *et al.*, 2001; Fuentes, 2007) podría estar indicando una alta susceptibilidad de los CS para infectarse con este virus, cuando están en presencia de animales que pueden servir como fuente de infección. Al respecto, Wentz *et al.*, (2003) y Everman, (2006) señalan que el ganado bovino es la fuente de infección más probable para los CS. Este concepto estaría apoyado en el hecho que los aislados de pestivirus obtenidos en este

estudio fueron VDVB-1 y VDVB-2 siendo estos los mismos genotipos identificados en el ganado bovino nacional (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006) a diferencia de lo que ocurre en el ganado ovino y caprino nacional, donde sólo se ha detectado el VDVB-1 (Muller, 2003).

Respecto a la aplicación de las dos pruebas de IFD e IPI para detectar la presencia de antígenos de pestivirus, en la mayoría de las muestras los resultados fueron similares con las dos pruebas, sin embargo, hubo 4 casos de alpacas y una de guanaco negativas en la IFD y una de cada especie negativa a IPI, a pesar de haberse realizado cinco pasajes en el proceso de aislamiento viral. La razón de estas diferencias pudo deberse a que en la prueba de inmunofluorescencia el conjugado contiene anticuerpos policlonales para las diferentes estructuras antigénicas del virus, en cambio, en la prueba de IPI se emplean anticuerpos monoclonales que están dirigidos a la proteína no estructural NS2-3 y a la proteína estructural E2. La intensidad de la fluorescencia varía entre las diferentes cepas y se asocia con la eficiencia replicativa en cultivos celulares propia de cada cepa (Edwards, 1990). En Chile, en un estudio en que se evalúan aislados virales de VDVB de distintos subgrupos resultados preliminares indican que el subgrupo VDVB-1j (Pizarro-Lucero, 2006) presenta una alta eficiencia replicativa a diferencia de otros subgrupos. Estos antecedentes son importantes de considerar cuando se tienen resultados negativos frente a una sola prueba de identificación de antígenos, y los diagnósticos clínicos o anátomo-patológicos hacen sospechar fuertemente de la participación del virus. También es importante considerar que cuando se tuvo varias muestras de un mismo animal, en algunos casos, no todas dieron resultados positivos sugiriéndose con esto que para hacer diagnóstico con los procedimientos aquí empleados es recomendable practicar el aislamiento viral en más de una muestra del animal.

El haber pesquisado VDVB-2 en CS es un antecedente no descrito en la literatura, ya que en todos los estudios en que se ha genotipificado pestivirus obtenidos de CS se ha identificado VDVB-1b (Carman *et al.*, 2005; Mattson *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; van Amstel y Kennedy, 2010), la razón de esto podría atribuirse a que en Chile los CS habrían estado en contacto con

bovinos infectados con este genotipo y lo que probablemente, no habría ocurrido en otras latitudes. El único reporte disponible de aislamiento de VDVB-2 fue obtenido de un dromedario con signos de enfermedad reproductiva y congénita (van Amstel y Kennedy, 2010).

La presentación clínica varía dependiendo de la cepa del virus, especie, edad, estado inmune y reproductivo del huésped (Ridpath, 2010). En bovinos la enfermedad reproductiva se debe a la infección directa el feto y el resultado depende de la etapa de la gestación en la cual ocurre (Ridpath, 2010), infecciones que ocurren entre los 42 y 125 días de gestación dan lugar a la reabsorción fetal, momificación, aborto, malformaciones congénitas como la hipoplasia cerebelar que no se observa en CS (van Amstel y Kennedy, 2010), o el establecimiento de los animales PI que al enfrentarse a una cepa citopática puede desarrollar enfermedad de las mucosas, los animales PI al entrar en un rebaño provocan la propagación del virus y de una infección aguda cuya gravedad dependerá de la cepa viral, el estado inmunitario y la presencia de patógenos secundarios (Bolin, 2002). La participación del VDVB como entidad patogénica para CS, discutida en un principio (Mattson 1994; Wentz *et al.*, 2003) hoy es asociada a diferentes cuadros clínicos de forma similar a lo que ocurre en el ganado bovino, ovino y caprino (Belknap *et al.*, 2000; Everman 2006; Byers *et al.*, 2009), donde el VDVB la mayoría de las veces produce infecciones subclínicas, obteniéndose aislados de VDVB de animales de apariencia clínica sana (Baker, 1987; Radostits y Littlejohns, 1988; Ridpath, 2003). En CS la enfermedad natural se presenta con anorexia leve, letargo suave y disminución del vellón, la presentación aguda es seguida de la introducción de individuos PI en un rebaño e incluye letargia y anorexia (Carman, 2005). Signos reproductivos apuntan a pérdidas embrionarias tempranas, abortos y nacimientos prematuros prematuro (Carman *et al.*, 2005;. Goyal *et al.*, 2002;. Mattson *et al.*, 2006;. Wentz *et al.*, 2003). La infección persistente puede originar una presentación aguda o crónica, siendo más común en CS la forma crónica que incluye signos como; baja ganancia de peso o bajo peso, diarrea crónica, inflamación de articulaciones, descarga nasal y neumonía (Carman *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2007;. Goyal *et al.*, 2002;. Mattson *et al.*, 2006;.

Wentz *et al.*, 2003). Las muestras procesadas en este estudio provenían de animales de apariencia clínica sana, de hembras que habían sufrido abortos y de animales muertos con características atribuibles a la acción de pestivirus, hecho que es similar a lo mencionado en la literatura. El rol patógeno del VDVB está asociado mayormente a las pérdidas reproductivas que incluyen infertilidad, muerte embrionaria, aborto, nacimiento de animales débiles y de animales PI, que mantienen el virus en los rebaños generando nuevas infecciones (Baker, 1987; Radostits y Littlejohns, 1988; Ridpath, 2003). No obstante, se debe tener presente que existe una alta variabilidad genómica, especialmente dentro del genotipo 1 del VDVB, lo que ha permitido identificar subgrupos dentro de los genotipos, que están asociados con variables antigénicas, diferente patogenicidad y diferentes grados de virulencia de los aislados (Becher *et al.*, 2003; Galav *et al.*, 2007; Bachofen *et al.*, 2008; Bachofen *et al.*, 2010), es así como en el ganado bovino, en algunas ocasiones también se producen enfermedades de mayor gravedad llegando a producirse mortalidad en animales de todas las edades, aislándose en estos casos VDVB-2 de alta virulencia (Carman *et al.*, 1998).

En este estudio, la obtención de aislados virales en animales cursando una patología como aborto, enfermedad respiratoria o muerte no podría atribuirse al VDVB como agente causal de dichas presentaciones, no obstante, en el proceso de aislamiento viral no se observó efecto citopático en los cultivos celulares, descartando la participación de virus citopatogénicos como VHB-1, VHE-1, VPI-3 y adenovirus que podrían ser responsables de los síndromes descritos. No obstante, la evidencia de infección de los CS con los dos genotipos del VDVB aún en ausencia de efectos nocivos, debe ser considerado tanto por el efecto que puede tener sobre la salud de los CS y su productividad, como por el rol de portador para el resto del ganado, y planteando la necesidad de identificar los subgrupos genómicos, así como, la virulencia y antigenicidad de los aislados que están afectando a estas especies de modo de establecer medidas que propendan a mejorar la sanidad de los CS y coordinar esfuerzos para establecer el control de la infección por pestivirus en el ganado de su misma y otras especies.

CONCLUSIONES

- Alpacas, llamas y guanacos introducidos desde otras regiones del país a cinco rebaños de la Región Metropolitana, están infectados con pestivirus.
- Los pestivirus que infectan a alpacas son VDVB-1 y VDVB-2.
- Los pestivirus que infectan a llamas y guanacos son VDVB-2.

BIBLIOGRAFIA

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

ARCE, C. 2001. Infección por pestivirus en un rebaño de alpacas de la zona central de Chile. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 42 pp.

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.

BACHOFEN, C.; BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; STALDER, H.; PETERHANS, E. 2010. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet. Microbiol.* 141: 258-267.

BARLOW, R.M.; RENNIE, J.C.; KEIR, W.A.; GARDINER, A.C.; VANTSIS, J.T. 1975. Experiments in border disease. VII. The disease in goats. *J. Comp. Path.* 85: 291-297.

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

BARLOW, R.M.; STOREY, I.J. 1997. Myelination of the ovine CNS with special reference to border disease I. Qualitative aspects. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 3: 237-253.

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

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

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.; MEYERS, G.; SHANNON, A.D.; THIEL, H.J. 1996. Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J. Virol.* 70: 2992-2998.

BECHER, P.; ORLICH, M.; THIEL, H.J. 1998. Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J. Virol.* 72: 5165-5173.

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

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; LARSEN, R.S.; CONRAD, K.P. 2000. Bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 568-570.

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

BONACIC, C. 1991. Características biológicas y productivas de los camélidos sudamericanos. *Avances en Medicina Veterinaria.* Vol 6(2). [en línea]

http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/CDA/avan_vet_completa/0,1424,SCID%253D9975%2526ISID%253D473,00.html [consulta: 06-6-2011].

BOLIN SR. 2002. Bovine viral diarrhea viruses in mixed infections. In: Brogden KM, Guthmiller JM, editors. Polymicrobial diseases. Washington, DC: ASM Press; p. 33–50.

BYERS, S. R.; SNEKVIK, K. R.; RICHTER, D. J.; EVERMANN, J. F.; BRADWAY, D. S.; PARISH, S. M.; BARRINGTON, G. M. 2009. Disseminated Bovine viral diarrhea virus in a persistently infected alpaca (*Vicugna pacos*) cria. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21: 145-148.

CARMAN, S.; CARR, N.; DELAY, J.; BAXI, M.; DEREGT, D.; HAZLETT, M. 2005. Bovine viral diarrhea virus in alpaca: abortion and persistent infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17:589–593.

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

CEBRA, C. K.; MATTSON, D. E.; BAKER, R. J.; SONN, R. .; DEARING, P. L. 2003. Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223:1806–1808.

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

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

CELEDÓN, M.; CARBONELL, J.; IBARRA, L.; PIZARRO, J. 1998. Detección de bovinos portadores e inmutotolerantes 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, J.; NAVARRO, C. 2001. Pesquisa de anticuerpos seroneutralizantes para pestivirus y herpesvirus en ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos de Chile. Arch. Med. Vet. 33: 165-172.

CEPEDA, C. P., NAVARRO, C, CELEDÓN, M.O. 2011. Prospección serológica del virus parainfluenza 3 en camélidos sudamericanos en Chile. Arch. Med. Vet. 43: 177-179.

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

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

DUNKEL, B.; DEL PIERO, F.; WOTMAN, K.L.; JOHNS, I. C.; BEECH, J.; ILKINS, P. A. 2004. Encephalomyelitis from West Nile Flavivirus in 3 Alpacas. J. Vet. Int. Med. 18: 365-367.

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

ESPEJO, R.; D. ESCANILLA. 1993. Detection of HIV 1 DNA by a simple procedure of polimerase chain reaction using “primer-dimer” formation as a internal control of amplification. Res. Virol. 144: 243-246.

ESPÍNDOLA. 1997. Estudio de mercado Camélidos de exportación Provincia de Parinacota. En: Taller, Definición de criterios de políticas de camélidos sudamericanos. Ministerio de Agricultura, ODEPA. Arica, 26 y 27 de Noviembre.

EVERMANN, J. F.; BARRINGTON, G. M.; Clinical features. In: **GOYAL, S. M.; RIDPATH, J.F.;** editors. Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control. Ames (IA): Blackwell Publishing; 2005. p. 105–20.

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

FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Chile. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. 72p.

FIA. FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA. 2000. Camélidos en Chile Situación actual y perspectivas. L. A. Raggi. Ed. Gobierno de Chile. 130pp.

FIA. FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA. 2002. Situación de los Camélidos Sudamericanos. Boletín Semestral N° 1. Ed. Gobierno de Chile. 2pp.

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

FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F; WEIBLEN, R; VOGEL, F. S; GIL, L. H. 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. Virus Res;87(1):51–60.

FOSTER, A. P. ; HOULIHAN, M. G.; HOLMES, J. P.; WATT, E. J.; HIGGINS, R. J.; ERRINGTON, J.; IBATA, G.; WAKELEY, P. R. 2007. Bovine viral diarrhoea virus infection of alpacas (*Vicugna pacos*) in the UK. Vet. Record. 161: 94-99

FOSTER, A. P.; HOULIHAN, M.; HIGGINS, R. J.; ERRINGTON, J.; IBATA, G.; WAKELEY, P. R. 2005. BVD virus in a British alpaca. Vet. Record. 156: 718-719.

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

FUENTES, R. A. 2007. Pesquisa de anticuerpos neutralizantes del virus de la diarrea viral bovina en alpacas y llamas del altiplano de la Región de Tarapacá. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 39pp.

GALAV V.; MISHRA A, N.; DUBEY, R.; RAJUKUMAR, K.; PITALE, S. S.; SHRIVASTAV, A. B.; PRADHAN, H.K. 2007. Pathogenicity of an Indian isolate of bovine viral diarrhea virus 1b in experimentally infected calves. Res. Vet. Sci. 83: 364–368.

GALBREATH, E. J.; HOLLAND, R. E.; TRAPP, A. L.; BAKER-BELKNAP, E.; MAES, R. K.; YAMINI, B.; KENNEDY, F. A.; GILARDY A. K.; TAYLOR, D. 1994.

Adenovirus-associated pneumonia and hepatitis in four llamas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:424-426.

GOYAL, S; M.; BOULJIHAD, M.; HAUGERUD, S.; RIDPATH, J. F. 2002. Isolation of bovine viral diarrhea virus from an alpaca. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14:523–525.

GRASSMANN, C.W.; ISKEN, O.; BEHRENS, S.E. 1999. Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *Vet. Microbiol.* 73: 9196-9205.

HARPIN, S.; MEHEDY ELATTI, S.; CUNNAGLIA, E.; YOLKEN, R.H.; ELAZHARY, Y. 1995. The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine diarrhea virus. *Arch. Virol.* 140: 1285-1290.

HENRICH, M.; REINACHER, M.; HAMANN, H. P. 2007. Lethal bluetongue virus infection in an alpaca. *Vet. Record.* 161: 764.

HORZINEK, M. C. 1973. The structure of togaviruses. *Prog. Med. Virol.* 16: 109-156.

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

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

INE. INSTITUTO NACIONAL ESTADISTICAS. 1997. VI Censo Agropecuario. Resultados Preliminares. Edición José Cayuela. Stgo. Chile, INE, 443 pp.

INE. INSTITUTO NACIONAL ESTADISTICAS. 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: 11-06-2011].

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

KAPIL, S.; YEARY, T.; EVERMANN, J.F. 2009. Viral Diseases of New World Camelids. *Vet. Clin. Food Anim.* 25: 323–337.

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

KÜMMERER, B. M.; TAUTZB, N.; BECHERB, P.; THIELB, H-J.; MEYERS, G. 2000. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses *Vet. Microbiol.* 136: 209-216.

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

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

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

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

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

LUBROTH, J.; YEDLOUTSCHNIG, R.J.; CLHANE, V.K.; MIKICIUK, P. 1990. Foot-and-mouth disease virus in the llama (*Lama glama*): diagnosis, transmission, and susceptibility. J. Vet. Diagn. Invest. 2:197-203.

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

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

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

MIRANDA, M.P.; CELEDÓN, M.O.; MACNIVEN, V.; FERRANDO, G.; PARRAGUEZ, V.H.; RAGGI, L.A. 2000. Aborto en alpacas: posible influencia de Pestivirus. Memorias PANVET "98- TL.57. pag 141.

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. De Ciencias Veterinarias y Pecuarias.xxx

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. S.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. (Eds.). 1995. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol. Suppl. 10: 415-427.

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

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

NETTLETON, P.F.; GILMORE, J.S.; HERRING, J.A.; SINCLAIR, J.A. 1992. the production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 15: 179-188.

NOLEN-WALSTON, R.; BEDENICE, D.; RODRÍGUEZ, C.; RUSHTON, S.; BRIGHT, A.; FECTEAU, M.-E.; SHORT, D.; MAJDALANY, R.; TEWARI, D.; PEDERSEN, D.; KIUPEL, M.; MAES, R. ; D DEL PIERO, F. 2007. Eastern equine encephalitis in 9 South American camelids. J.Vet. Inter. Med. 21: 846–852.

ODBILEG, R.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; ONUMA, M. 2005. Molecular cloning and phylogenetic analysis of inflammatory cytokines of *Camelidae* (llama and camel). J. Vet. Med. Sci. 67: 921-925.

ODEON, A.C.; KELLING, C.L.; MARSHALL, D.J.; ESTELA, E.S.; DUBOVI, E.J.; DONIS, R.O. 1999. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93). J. Vet. Diagn. Invest. 11: 221-228

OIE. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. 2008. Bovine viral diarrhoea. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals

(mammals, birds and bees). cap.2.4.8. [en línea] <http://www.oie.int/eng/Normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08_BVD.pdf>. [consulta: 11-07-2011]

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

ORR, M.B. 1982. Pathology on the skin and fleece. In: Border disease of sheep: a virus-induced teratogenic disorder. *Adv. Vet. Med.* 36: 13-21.

PARREÑO, V.; BOK, K.; FERNÁNDEZ, F.; GÓMEZ, J. 2004. Molecular characterization of the first isolation of rotavirus in guanacos (*Lama guanicoe*). *Arch. Virol* 149: 2465–2471.

PARREÑO, V.; COSTANTINI, V.; CHEETHAM, S.; BLANCO VIERA, J.; SAIF, L.J.; FERNÁNDEZ, F.; LEONI, L.; SCHUDEL, A. 2001. First isolation of rotavirus associated with neonatal diarrhoea in guanacos (*Lama guanicoe*) in the Argentinean Patagonia Region. *J. Vet. Med. B.* 48: 713-720.

PARREÑO, V.; MARCOPPIDO, G. 2006. Estudio de la sanidad en camélidos: avances a partir de la obtención de muestras de camélidos silvestres. **In:** Vilá, B (Ed). Investigación, conservación y manejo de vicuñas. Proyecto Manejo Sostenido de Camélidos Silvestres (MACS). pp. 147-161.

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

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

PATTERSON, D.S.P.; TERLECKI, S.; FOULKES, J.A.; SWEASEY, D.; GLANCY, E.M. 1975. Spinal cords lipid and myelin composition in border disease (hypomyelinogenesis congenita) of lambs. *J. Neurochem.* 24: 513-522.

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

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

POTGIETER, L.N.D.; McCRAKEN, M.D.; HOPKINS, F.M.; WALKER, R.D.; GUY, J.S. 1984. Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* 45: 1582-1585.

PROCHILE. DIRECCIÓN DE PROMOCIÓN DE EXPORTACIONES. 1993. Las exportaciones de alpacas chilenas a Australia. Oficina Comercial Pro-Chile-Australia. Ed. Marcelo Salas. Sidney, julio 1993. Mimeografiado 13pp.

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

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

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

RAMSEY, F.; CHIVERS, W. 1953. Mucosal disease of cattle. North Am. Vet. 34: 629-633.

REBHUN, W.C.; JENKINS, D.H.; RIIS, R.C.; DILL, S. G.; DUBOVI, E.J.; TORRES, A. 1988. An epizootic of blindness and encephalitis associated with herpesvirus indistinguishable from equine herpesvirus 1 in a herd of alpacas and llamas J. Am. Vet. Med. Assoc. 192: 953-956.

REBHUN, W.C.; FRENCH, T.W.; PERDRIZET, J.A.; DUBOVI, E.J.; DILL, S.G.; KARCHER, L.F.1989. Trombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. J. Vet. Int. Med. 3 : 42-60 1989

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

RIDPATH, J. F. 2010. Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. Vet. Clin. Food Anim. 26: 105–121.

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

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

SCHULMAN F.Y.; KRAFFT, A.E.; JANCZEWSKI, T.; REUPERT, R.; JACKSON, K.; GARNER, M.M. 2003. Camelid mucocutaneous fibropapillomas: Clinicopathologic findings and association with papillomavirus. *Vet. Pathol.* 40: 103

SHIMAZAKI, T.; SEKIGUCHI, H.; NAKAMURA, S.; TAGUCHI, K.; SATOH, M. 1998. Segregation of bovine viral diarrhoea virus isolated in Japan into genotypes. *J. Vet. Med. Sci.* 60:579-583.

SUMAR, J. 1997. Evolución y desarrollo de la ganadería camélida en el altiplano de Latinoamérica. En: *El Altiplano, Ciencia y Conciencia en los Andes, Actas del II Simposio Internacional de Estudios Altiplánicos 19-21 de Octubre de 1993, Arica – Chile, Vicerrectoría Académica y Estudiantil, Departamento de Posgrado y Postítulo, Universidad de Chile.* pp 9-15

TADICH, N.; NETTLETON, P. MORGAN, K.; HODGSON, A.; MACAULAY, R.; REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S. 1998. Seroprevalencia de border disease en 22 ovejerías del sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 30: 191-196.

TERPSTRA, C. 1981. Border disease: virus persistence, antibody response and transmission studies. *Res. Vet. Sci.* 30: 185-191

THIEL, H.J.; PLAGEMAN, P.; MOENNIG, V. 1996. Pestiviruses. In: Fields, B.N; Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds). *Fields Virology*, 3ª Edición. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, Estados Unidos de Norteamérica. Pp. 1059-1074.

TOPLIFF, C. L.; SMITH, D. R.; CLOUSER, S. L.; STEFFEN, D. J.; HENNINGSON, J. N.; BRODERSEN, B. W.; BEDENICE, D.; DACVECC, D.; CALLAN,; REGGIARDO, C.; KURTH, K. L.; KELLING, C. L. 2009. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infections in alpacas in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234: 519-529.

TSUR, I.; HARMELIN, A.; DVIR, I.; YANAI, J. 1996. Meningoencephalitis and brain abscessation due to *Escherichia coli* in a 2 week old alpaca cria. Aust. Vet. J. 74: 437-438.

UNDERWOOD, W.J.; MORIN, D.E.; MIRSKY, M.L.; HASCHEK, W.M.; ZUCKERMANN, F.A.; PETERSEN, G.C.; SCHERBA, G. 1992. Apparent Retrovirus -induced immunosuppression in a yearling llama. J. Am. Vet. Med. Assoc. 200:358-362.

VAN AMSTEL, S.; KENNEDY, M. 2010. Bovine viral diarrhoea infections in new world camelids-A review. Small Rum. Res. 91: 121-126

VERGARA, J. F. 2004. Primera detección en Chile de anticuerpos seroneutralizantes contra herpesvirus equino tipo 1 en camélidos sudamericanos. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. De Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 45pp.

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

VILCEK, S.; NETTLETON, P.F.; PATON, D.J.; BELAK, S. 1997. Molecular characterization of ovine pestiviruses. J. Gen. Virol. 78: 725-735.

VILCEK, S.; PATON, D. J.; DURKOVIC, 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(1):99-115

WADDL. WASHINGTON ANIMAL DISEASE DIAGNOSTIC LABORATORY 2006. Bovine Viral Diarrhea Virus in Camelids. [en línea] http://www.vetmed.wsu.edu/depts_waddl/BVDCamelids.aspx . [consulta 6-7-2011]

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

WHEELER, J.C. Origen, evolución y status actual. En: Fernández-Baca, S (ed) Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago, Chile. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, 1991. pp. 11-48.

WHITEHEAD, C. E.; ANDERSON, D.E. 2006. Neonatal diarrhoea in llamas and alpacas. Small Ruminant Research. 61: 207–215.

WILLIAMS, R. J.; EVERMANN, J. F.; BEEDE, R. F.; SCOTT, E. S.; DILBECK, P. M.; WHETSTONE, C. A. ; STONE, D. M. 1991. Association of bovine herpesvirus type 1 in a llama with bronchopneumonia. J. Vet. Diagn. Invest. 3: 258-260.

XUE, F.;ZHU, Y. M.; LI, J.; ZHU, L. C.; REN, X. G.; FENG, J. K.; SHI, H. F.; GAO, Y. R. 2010. Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China between 2005 and 2008. Vet. Microbiol. 143(2-4): 379-383.