



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

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA  
PESTIVIRUS Y ALFAHERPESVIRUS DE RUMIANTES EN  
ARTIODÁCTILOS DEL PARQUE ZOOLOGICO BUIN ZOO,  
REGIÓN METROPOLITANA, CHILE**

**RODRIGO ALEJANDRO SALGADO MOYA**

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

PROFESOR GUÍA: JOSÉ LEONARDO PIZARRO LUCERO  
Unidad de Virología. Departamento Medicina Preventiva Animal  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE  
2014



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

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA  
PESTIVIRUS Y ALFAHERPESVIRUS DE RUMIANTES EN  
ARTIODÁCTILOS DEL PARQUE ZOOLOGICO BUIN ZOO,  
REGIÓN METROPOLITANA, CHILE**

**RODRIGO ALEJANDRO SALGADO MOYA**

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

Nota Final .....

NOTA

FIRMA

PROFESOR GUÍA : JOSÉ PIZARRO LUCERO ..... ..

PROFESOR CORRECTOR : CARLOS NAVARRO VENEGAS ..... ..

PROFESOR CORRECTOR : HÉCTOR HIDALGO OLATE ..... ..

SANTIAGO, CHILE  
2014

## **Agradecimientos**

La siguiente memoria de título es la expresión escrita del fin de una etapa en mi desarrollo como profesional y crecimiento como persona. Pese a que es un trabajo individual, no podría haberse llevado a cabo sin el apoyo que tuve de mucha gente, tanto en el proceso mismo de su desarrollo, como también en el previo periodo universitario. Toda esta etapa estuvo llena de logros, alegría y emoción, pero también de dudas y temores, que sin esas personas difícilmente podría haberla superado, y son a quienes les agradezco y dedico esta memoria.

En primer lugar, agradezco a mis padres y hermana, quienes han sido mi apoyo incondicional y mi motor para seguir adelante. Gracias por estar siempre apoyándome en este camino, desde su inicio, en los momentos negros en que quise no continuar, así como también, en el nuevo proceso que he comenzado, pese al gran costo de no poder vernos a diario. Gracias por creer en mí. Los amo.

A mis amigos que conocí en este camino universitario, Felipe, Eric y la Viole, que han sido mi alegría y apoyo innumerables veces, tanto dentro como fuera del campus, y que a través de ellos logré conocerme mejor y desarrollarme emocionalmente.

A mis amigos de la vida, Ariel, Edu, Flavio y Bastián, quienes han sido mi compañía durante todo este proceso y más. Gracias por aguantar mis mañas y mi desorden, y también gracias por tantos momentos felices que me han dado y los que me han permitido darles. Han sido y serán siempre mis amigos y compañeros de la vida.

A Ezequiel Hidalgo por depositar su confianza en mí para este proyecto y quien me ha alentado en el camino de la investigación.

A Elcira, mi gran compañera y amiga en el laboratorio. A las doctoras Celedón e Isabel y al doctor Pizarro, por todo lo que me enseñaron, sus consejos y su simpatía.

Finalmente a Doris Riquelme, quien fue un gran aliento durante el desarrollo de esta memoria. Sus palabras lograron que me levantara y siguiera adelante en momentos muy difíciles e hicieron darme cuenta de lo hermoso y valioso que soy, y que todo este trabajo está y seguirá dando frutos.

## RESUMEN

La identificación y control de agentes infecciosos son parte fundamental del manejo sanitario en animales silvestres en cautiverio. El Virus Diarrea Viral Bovina y el Herpesvirus bovino tipo 1 son reconocidos agentes virales que poseen la capacidad de infectar a múltiples especies de ungulados tanto domésticos como silvestres. Así, en este estudio se realizó un análisis serológico para ambos agentes infecciosos en artiodáctilos presentes en el Parque Zoológico Buin Zoo, ubicado en la comuna de Buin, Región Metropolitana. Estos correspondieron a 112 animales de las familias *Bovidae*, *Cervidae*, *Camelidae*, *Giraffidae* y *Suidae*, cuyas muestras de suero fueron recolectadas en dos ocasiones, entre Julio del año 2011 y Enero del año 2013. Siete pudúes, tres alpacas y un guanaco resultaron seropositivos a Virus Diarrea Viral Bovina (Pestivirus), correspondiendo al 9,82%, mientras que ningún animal resultó seropositivo a Herpesvirus bovino tipo 1 (Alfaherpesvirus).

El hallazgo de resultados positivos en algunos animales que nacieron en el parque y la presencia de seroconversión en otros, permitieron concluir que la infección con pestivirus ocurrió dentro del recinto. La presencia de anticuerpos en todos los ejemplares de pudú con la excepción de uno, llevó a la sospecha de que el animal seronegativo se trataba de un persistentemente infectado, lo cual fue confirmado posteriormente mediante PCR. El hallazgo de un pudú persistentemente infectado establece un nuevo precedente respecto a la epidemiología de los pestivirus, donde ésta especie podría actuar como reservorio. Para comprender mejor este aspecto son necesarios estudios futuros, así como también, para conocer el rol de los Pestivirus como agente patógeno en los pudúes y como amenaza en su conservación.

## **ABSTRACT**

Identification and control of infectious agents are a fundamental part of health management in wild animals in captivity. Bovine Viral Diarrhea Virus and Bovine Herpesvirus type 1 are recognized viral agents that have the ability to infect multiple species of both domestic and wild ungulates. Serological testing for both viruses was made in artiodactyls of the Buin Zoo Park, located in Buin, Region Metropolitana, which corresponded to 112 animals of the families *Bovidae*, *Cervidae*, *Camelidae*, *Suidae* and *Giraffidae*. Samples were collected from two surveys conducted between July 2011 and January 2013. Seven pudús, three alpacas and one guanaco were seropositive to Bovine Viral Diarrhea Virus (Pestivirus), while no animals were seropositive to Bovine Herpesvirus type 1 (Alphaherpesvirus).

Positive results in some animals that were born in the park and the presence of seroconversion in other ones allowed concluding that pestivirus infection occurred within the zoo park. The presence of antibodies in all pudús with the exception of one, led to the suspicion that the seronegative animal was a persistently infected, which was subsequently confirmed by PCR. The finding of a persistently infected pudú sets a new precedent for the epidemiology of pestivirus, where this species could act as a reservoir. Further studies are needed to better understand this aspect, as well as to learn about the role of Pestivirus as a pathogen in pudús and a threat in their preservation.

## INTRODUCCIÓN

Los Parques Zoológicos son lugares con condiciones ambientales favorables para la transmisión de enfermedades infecciosas entre los animales, debido a la proximidad entre las distintas especies, originarias de todas partes del mundo, la mayoría de las cuales nunca hubiese tenido contacto entre ellas (Probst *et al.*, 2011). En estos recintos, además se establece proximidad con las personas, tanto quienes visitan los parques como quienes trabajan en ellos. Las infecciones pueden causar problemas de salud e incluso mortalidad en los animales, los que a su vez, también pueden actuar como reservorio de algunos agentes (Simpson, 2002).

Los parques zoológicos, además, no son sistemas de crianza cerrados. Un flujo de entrada y salida de animales se produce tanto por intercambios con otros centros de crianza o exhibición, como también por el rol que cada vez tienen en la conservación de las especies, por eventuales planes de reintroducción. Es por esto que la identificación y control de agentes infecciosos son parte fundamental del manejo sanitario de animales silvestres en cautiverio.

El Parque Zoológico Buin-Zoo (PZBZ) ubicado en la comuna de Buin, Región Metropolitana, hasta tiempos recientes carecía de información sobre el contacto de sus animales frente a diversos agentes infecciosos. Lo anterior, sumado a casos de abortos ocurridos en diversas especies de ungulados (pudúes, camélidos sudamericanos y muflones) durante los últimos tres años y cuyos análisis patológicos sugirieron una causa infecciosa, ha gatillado la investigación sobre distintos agentes abortivos en su colección<sup>1</sup>.

El Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB) y el Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, también llamado Herpesvirus Bovino tipo 1 (HVB-1), son reconocidos agentes infecciosos que causan enfermedad reproductiva en el ganado doméstico, causando grandes pérdidas económicas y que, a su vez, poseen la capacidad de infectar a múltiples especies domésticas y silvestres (Nettleton *et al.*, 1988; Passler y Walz, 2009).

---

<sup>1</sup> Comunicación personal: Hidalgo, E. Director del Departamento de Conservación e Investigación del zoológico Buin Zoo, 21 de enero, 2012.

El VDVB puede infectar a una gran variedad de mamíferos del orden *Artiodactyla*, reportándose evidencia serológica en más de 50 especies, que abarcan a siete familias de este orden: *Antilocapridae*, *Bovidae*, *Camelidae*, *Cervidae*, *Giraffidae*, *Suidae* y *Tragulidae* (Passler y Walz, 2009). También se ha logrado detectar mediante técnicas virológicas en nueve especies de cérvidos, 10 de bóvidos, además de llamas (*Lama glama*), alpacas (*Vicugna pacos*), camello bactriano (*Camelus ferus*), dromedario (*Camelus dromedarius*), ciervo ratón de Java (*Tragulus javanicus*) y antílope americano (*Antilocapra americana*) (Doyle y Heuschele, 1983a; Vilcek y Nettleton, 2006; Nelson *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2013). Por su parte, se ha registrado presencia de anticuerpos contra HVB-1 en sueros de más de 20 especies de bóvidos, en seis especies de ciervos, así como también, en camélidos sudamericanos, antílope americano (*A. americana*), jirafas (*Giraffa camelopardalis*) e hipopótamos (*Hippopotamus amphibius*) (Rampton y Jessett, 1976; Hedger y Hambling, 1978; Doyle y Heuschele, 1983b; Nettleton *et al.*, 1988; Borchers *et al.*, 2002; Marcoppido *et al.*, 2010; Morán *et al.*, 2010). Aunque sólo se ha aislado el HVB-1 de especies silvestres tales como ciervo mulo (*Odocoileus hemionus*), ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y búfalo (*Bubalus bubalis*), luego de infecciones experimentales (Chow y Davis, 1964; Mollema *et al.*, 2005; Scicluna *et al.*, 2010), se han detectado infecciones naturales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en corzos (*Capreolus capreolus*), ciervos rojos (*C. elaphus*), ciervos dama (*Dama dama*) y muflones (*Ovis musimon*) en Hungría, evidenciando que el virus está ampliamente distribuido entre las poblaciones silvestres de estos animales (Kálmán y Egyed, 2005).

Ambos agentes virales se encuentran en Chile, produciendo infecciones de carácter endémico en la población ganadera y de notificación obligatoria ante el SAG (SAG, 2013). En la Región Metropolitana, la seroprevalencia en ganado bovino en plantales lecheros es alta para ambos virus, correspondiendo a 60% y 43% para VDVB y HVB-1 respectivamente (Celedón *et al.*, 1996).

El término VDVB hace referencia a un grupo diverso de virus ARN del género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae*, que engloba a dos especies o genotipos: VDVB-1 y VDVB-2. Por otro lado, también se puede clasificar en biotipos, según sus efectos en cultivos celulares, existiendo el biotipo citopático (cp) y no citopático (ncp), los cuales son independientes del

genotipo. Su transmisión puede ser vertical u horizontal, principalmente por contacto directo, aunque se describe transmisión indirecta a través de aerosoles a corta distancia o fomites. En bovinos, puede comprometer los sistemas inmune, hematológico, neurológico, respiratorio, digestivo y/o reproductivo por lo que las manifestaciones clínicas que causa son diversas y están supeditadas a la edad del animal, estado inmunológico y momento de la gestación en el que se produce la infección (Walz *et al.*, 2010). En una hembra gestante seronegativa, el virus atraviesa la placenta antes de la formación de anticuerpos, pudiendo ocasionar muerte embrionaria temprana, aborto, momificación y/o defectos congénitos. Los fetos que sobreviven a la infección de un VDVB ncp entre los días 45 y 125 de gestación, momento en que el sistema inmune se encuentra en fase de auto-reconocimiento, desarrollan tolerancia inmune al virus y se convierten en persistentemente infectados (PI) (Grooms *et al.*, 2004). A diferencia de un animal con infección aguda, el cual elimina el virus al ambiente en baja cantidad y por un corto periodo de tiempo, los animales PI lo presentan y eliminan al ambiente por todas sus secreciones y excreciones en forma continua de por vida, siendo estos el principal reservorio y fuente de diseminación del VDVB (Thurmond, 2005). Además de los efectos directos que puede causar en el organismo, este virus también suprime varios componentes de la inmunidad innata y adaptativa, predisponiendo a infecciones secundarias (Ridpath, 2010). De esta manera, el VDVB puede ser de importancia en enfermedades polimicrobianas como el complejo respiratorio bovino.

Se ha reportado enfermedad a causa del VDVB en otras especies además del ganado doméstico. En el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), se puede desarrollar una infección aguda con fiebre y letargia, trastornos reproductivos como reabsorción embrionaria, momificación, aborto, e incluso dan origen a crías PI (Ridpath *et al.*, 2008). En estos animales se ha demostrado la capacidad de transmitir el virus a otros individuos de su misma especie, así como también a bovinos y viceversa (Passler *et al.*, 2009; Passler *et al.*, 2010; Negrón *et al.*, 2012). En camélidos sudamericanos, también se ha evidenciado infección aguda, trastornos reproductivos y generación de PI tanto en llamas como en alpacas (Wernery, 2012). Se han registrado casos de aborto en cabras pigmeas (*Capra hircus*) y diarrea con posterior muerte en un antílope acuático (*Kobus ellipsiprymnus*) en los zoológicos de Memphis y San Antonio, Estados Unidos, respectivamente, aislándose en ambos casos el VDVB (Doyle y Heuschele, 1983a). También se ha diagnosticado el estado



de PI en cabras blancas (*Oreamnos americanus*) halladas muertas en el parque zoológico de Idaho (Nelson *et al.*, 2008); y en ciervos ratón de Java (*T. javanicus*) en los zoológicos de Copenhague (Dinamarca) y Ámsterdam (Países Bajos) (Grøndahl *et al.*, 2003).

Por su parte, el HVB-1 es un virus ADN del género *Varicellovirus*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*. La infección primaria en el ganado doméstico se acompaña de diversas manifestaciones clínicas como rinotraqueitis, aborto, vulvovaginitis pustular en hembras o balanopostitis pustular en machos, e infección sistémica fatal en neonatos. Este virus también juega un rol importante en el complejo respiratorio bovino, favoreciendo la infección bacteriana al causar inmunosupresión y daño en el epitelio respiratorio. La transmisión es principalmente por contacto directo nariz con nariz o por cópula, aunque también se registra transmisión por aerosoles a corta distancia. Los abortos ocurren luego que el virus, como consecuencia de la infección del tracto respiratorio en una hembra gestante seronegativa, realiza viremia y atraviesa la placenta infectando al feto. Cuando los animales sobreviven, se establece una infección latente de por vida en los ganglios nerviosos. Frente a inmunosupresión, ocurre una reactivación viral que puede llevar a su re-excreción, lo cual es responsable del mantenimiento del virus dentro de un rebaño (Muylkens *et al.*, 2007). Casos clínicos por HVB-1 en animales silvestres sólo se han registrado, luego de infección experimental, en un grupo de ciervos mulo (*O. hemionus*) quienes presentaron anorexia, depresión, salivación, disnea y tos (Chow y Davis, 1964); y ñúes azules (*Connochaetes taurinus*) que desarrollaron vulvovaginitis (Mushi y Karstad, 1979).

Los estudios serológicos realizados en busca de una eventual infección con VDVB y/o HVB-1 en especies silvestres son numerosos y de diversa naturaleza, ya sea en el número de animales muestreados, las especies involucradas, así como el tipo de técnica utilizada. Se han realizado tanto en poblaciones de vida libre como en cautiverio, con resultados variables (Nettleton *et al.*, 1988; Aguirre *et al.*, 1995; Frölich *et al.*, 2006; Passler y Walz, 2009; Wernery, 2012). Se considera al ganado doméstico como la fuente de infección de estos virus a las especies silvestres, no obstante, se han detectado altas prevalencias de infección, tanto para VDVB como HVB-1, en diversas poblaciones de ciervos en su ambiente natural, con registro en algunas de no haber tenido contacto con ganado durante

décadas, sugiriéndose la presencia de una infección endémica en estas poblaciones (Elazhary *et al.*, 1981; Lamontagne *et al.*, 1989; Van campen *et al.*, 2001; Lillehaug *et al.*, 2003; Tryland *et al.*, 2005; Kautto *et al.*, 2012). Hallazgos de ciervos de cola blanca PI en la naturaleza sustentan la idea de que el VDVB puede mantenerse dentro de poblaciones silvestres (Duncan *et al.*, 2008).

En parques zoológicos, se ha registrado seropositividad contra ambos virus en ungulados silvestres tanto en Estados Unidos como en Europa. Doyle y Heuschele (1983a y 1983b) evaluaron muestras de suero para la detección de anticuerpos contra ambos agentes infecciosos, en rumiantes silvestres presentes en 31 zoológicos de Estados Unidos, resultando de un total de 1390 animales, 60 (4,3%) seropositivos a VDVB, y de un total de 1146 animales, 34 (2,9%) seropositivos a HVB-1 (Doyle y Heuschele, 1983a; 1983b). El estudio realizado en Europa, analizó sueros de 926 individuos representantes de 69 especies distintas de bóvidos, cérvidos y camélidos, provenientes de un zoológico checo y diez zoológicos alemanes. Sólo un 1,4% y 1,5% resultaron seropositivos a VDVB y HVB-1, respectivamente (Probst *et al.*, 2011). En este estudio además, se recopiló la información de archivos veterinarios con resultados de análisis serológicos realizados entre los años 1998 y 2004 de ocho de los 11 zoológicos. La búsqueda arrojó un total de 21 casos seropositivos (27,3%) a VDVB de un total de 90 individuos, considerándose a este pestivirus como enzoótico dentro de los zoológicos investigados (Probst *et al.*, 2011).

Los resultados de presencia de anticuerpos contra ambos agentes virales en animales silvestres deben interpretarse con precaución pues existe reactividad serológica cruzada entre VDVB y otros Pestivirus, así como también, entre HVB-1 y otros Alfaherpesvirus que infectan a rumiantes (Thiry *et al.*, 2006; Passler y Walz, 2009). Las pruebas serológicas disponibles son incapaces de discriminar entre ellos, aunque están siendo desarrolladas nuevas herramientas (Thiry *et al.*, 2006). Por esta razón, en estricto rigor, los resultados positivos a anticuerpos contra VDVB y HVB-1 deben referirse como positivos a Pestivirus y Alfaherpesvirus respectivamente. Aunque en Chile, no obstante, el único pestivirus descrito es el VDVB, al igual que con los Alfaherpesvirus de rumiantes, en que tampoco se han descrito otras especies virales, a excepción de HVB-1.

Los métodos diagnósticos más utilizados para detectar anticuerpos contra estos virus son la prueba de ELISA (indirecto o por competencia) y la seroneutralización (SN) (OIE, 2010). Si bien el ELISA es un método rápido y fácil de realizar, se reconoce a la SN como la prueba oficial o “estándar de oro”, por su alta sensibilidad y especificidad (OIE, 2010). Esta técnica permite identificar y cuantificar los anticuerpos séricos capaces de neutralizar el ingreso del virus a las células. Para su realización se requiere de cepas virales además de células de cultivo, donde la línea celular Madin-Darby de riñón bovino (MDBK), susceptible a ambos virus, es una de las más utilizadas (OIE, 2010).

Considerando el alto número de especies susceptibles a la infección por VDVB y HVB-1 y los casos de aborto ocurridos en el PZBZ, el objetivo de esta Memoria de Título fue determinar la presencia de infección con estos virus, a través de la búsqueda de anticuerpos neutralizantes contra pestivirus (VDVB) y alfaherpérvirus (HVB-1) en sueros de animales artiodáctilos presentes en el Parque Zoológico Buin Zoo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales y muestreo.** La población de estudio consistió en todos los ejemplares silvestres del orden *Artiodactyla* presentes en el Parque Zoológico Buin Zoo. Esta comprendió un total de 112 animales, correspondientes a 17 gacelas de Thompson (*Gacella Thomsoni Thomsoni*), 1 antílope sitatunga (*Tragelaphus spekii*), 3 antílopes nyalas (*Tragelaphus angasii*), 24 muflones (*Ovis orientalis musimon*), 12 ciervos dama (*Dama dama*), 5 ciervos rojos (*Cervus elaphus*), 8 pudúes (*Pudu puda*), 2 camellos bactrianos (*Camelus bactrianus*), 3 guanacos (*Lama guanicoe*), 12 jabalíes (*Sus scrofa*) y 3 jirafas (*Giraffa camelopardalis*). También se incluyeron a todas las llamas (*Lama glama*) y alpacas (*Vicugna pacos*) del recinto, las cuales, en estricto rigor, son especies domésticas, y correspondieron a 5 y 17 ejemplares respectivamente. Ningún animal del parque ha sido vacunado contra ninguno de los dos virus del estudio. Los hipopótamos pigmeos presentes en el parque no fueron incluidos por dificultades técnicas en su inmovilización y extracción de sangre.

La cantidad de animales corresponde a individuos que estuvieron presentes en el PZBZ dentro del período comprendido entre los meses de Julio del año 2011 y Enero del año 2013. Durante este tiempo se realizaron dos muestreos. El primero (M1) fue realizado entre el mes de julio del año 2011 y Enero del año 2012, mientras que el segundo muestreo (M2), fue realizado entre el mes de Julio del año 2012 y Enero del año 2013. Para la mayoría de los animales se obtuvo una muestra en cada periodo de muestreo (M1 y M2), pero debido a algunas salidas e ingresos de ejemplares, ya sea por muerte, venta, compra o nacimientos, hay animales que sólo fueron muestreados en la primera toma de muestras o sólo en la segunda.

Las muestras correspondieron a suero sanguíneo. La obtención de sangre fue realizada durante los procedimientos de medicina preventiva a los que son sometidos habitualmente los animales del zoológico. El M1 fue efectuado por otros memoristas, con el objetivo de estudiar *Leptospira interrogans* y *Brucella abortus*, y mantener un banco de suero de los animales del zoológico. En el M2, el memorista del presente estudio participó en la obtención de sangre, traslado de la muestra y extracción y almacenamiento del suero. Para este segundo muestreo no se obtuvieron muestras de jirafas, camellos y sitatunga, por no

estar calendarizados en los procedimientos de medicina preventiva del zoológico para ese año.

La obtención de sangre fue mediante punción venosa, utilizando jeringas y agujas hipodérmicas estériles desechables, depositándola en tubos estériles al vacío de tapa roja sin aditivo o con pro-coagulante. El criterio de elección del volumen de la jeringa y del calibre de la aguja, así como también, la vena para realizar la venopunción y la cantidad de sangre a colectar, se basó en la especie, la edad y masa corporal de los animales. Este procedimiento fue realizado por profesionales entrenados en el manejo de las especies implicadas, bajo las normas de bioseguridad y bienestar animal utilizados en el parque zoológico. El memorista participó en los procedimientos, siendo supervisado en todo momento por los Médicos Veterinarios encargados y en algunas ocasiones, procedió a tomar algunas muestras.

Las muestras de sangre fueron transportadas inmediatamente finalizado el procedimiento hasta las dependencias del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), donde se sometieron a centrifugación a 3500xg por 5 min, extrayéndose la fracción del suero mediante el uso de micropipetas. El suero se guardó en tubos de plástico de 1,5 mL debidamente identificados, en congelación a -20° C hasta su utilización.

Para la detección de anticuerpos contra HVB-1, se utilizaron preferentemente muestras de M2, no obstante, debido al ingreso o salida de ejemplares, además de muestras en mal estado o volumen deficiente, se usaron, para algunos casos, muestras de M1. Para la detección de anticuerpos contra VDVB, se utilizaron muestras de ambos periodos de muestreo de cada animal, para de esa manera detectar potenciales inmunotolerantes al virus. Sin embargo, también hubo algunos ejemplares para los que no se dispuso de muestra en uno de los periodos por las razones expuestas anteriormente.

**Cultivos celulares.** Se empleó células de la línea celular MDBK, cultivadas en Medio Esencial Mínimo (MEM), suplementado con suero equino como factor de crecimiento (5-8%).

Para subcultivar las células, a monocapas confluentes, se procedió a retirar el medio de cultivo de la botella, se lavó con solución salina A de Puck (Puck *et al.*, 1961) y luego se adicionó 0,5 mL de tripsina- verseno (tripsina 0,05% y verseno 0,02% en solución salina A de Puck), incubándose por 15-20 min. a 37°C. Luego, las células desprendidas fueron contadas en una cámara de Neubauer y la concentración se ajustó a 100.000 células/ml en MEM y suero equino 5%. Posteriormente, las células se sembraron en microplacas de 96 pocillos de fondo plano o en botellas de 25 cm<sup>2</sup>. Las microplacas fueron cubiertas con Parafilm® e incubadas en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. La siembra celular en los pocillos de la microplaca fue realizada un día antes de efectuar la SN o la inoculación de diluciones virales para la titulación viral, con el objetivo de asegurar al menos un 80% de confluencia celular.

**Virus.** Para la detección de anticuerpos contra VDVB mediante SN, se dispuso de la cepa citopática NADL de E.E.U.U, la cual corresponde al genotipo VDVB-1. Para la detección de anticuerpos contra HVB-1 mediante SN, se dispuso de la cepa citopática Los Ángeles de Chile.

**Titulación de las cepas virales.** A la suspensión viral inicial se le realizaron diluciones en base 10 desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-7</sup> en MEM, para lo cual se dispuso de siete tubos de 1,5 ml con 900 µL de MEM cada uno. Cien µL del virus inicial se agregó al primer tubo, estableciéndose la dilución 10<sup>-1</sup>; luego 100 µL de la primera dilución se agregaron al tubo 2 (dilución 10<sup>-2</sup>); y así sucesivamente, repitiendo el procedimiento hasta obtener el séptimo tubo con una dilución de 10<sup>-7</sup> de la suspensión viral original.

Posteriormente, luego de retirar el medio de cultivo de los pocillos de las microplacas, las células se infectaron con 50 µL de cada dilución viral, en quintuplicado para cada dilución. La microplaca fue incubada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, y fue observada a las 48 y 72 horas en el caso de VDVB y a las 24 y 48 horas en el caso de HVB-1, para la visualización de efecto citopático. El título de la suspensión viral original fue el recíproco de la dilución viral capaz de producir efecto citopático en el 50% de los pocillos de células, expresándose en dosis infectante de cultivo de tejido 50% (DICT<sub>50</sub>)/ 50 µL (Reed y Muench, 1938).

Como control de viabilidad celular se usó células sólo con 50 µL de MEM (sin virus).

**Determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes contra VDVB y HVB-1.** Para ello se utilizó la prueba de Dilución Punto Final Seroneutralizante (DPFS), un tipo de SN que emplea diluciones en base 2 del suero, con una cantidad fija de virus. Para ello, los sueros se sometieron previamente a 56° C por 30 minutos para la inactivación del complemento.

En pocillos de microplacas de 96 pocillos se agregaron en duplicado 50 µL de diluciones al doble de cada muestra de suero, desde la dilución 1/2 hasta 1/128. Posteriormente se agregó 200 DICT<sub>50</sub> de VDVB, ó 100 DICT<sub>50</sub> de HVB-1, según fuera el caso, según lo descrito por la OIE (OIE, 2010). Como control de toxicidad del suero, se agregó 50 µL de suero y 50 µL de MEM, también en duplicado. Luego de incubar por una hora a 37°C el contenido de cada pocillo fue traspasado a una microplaca de 96 pocillos con células MDBK, respetando el mismo orden en el que estaban dispuestas las mezclas de suero-virus.

Paralelamente a la ejecución de la prueba en los sueros de los animales del zoológico, se analizaron controles de suero negativos a anticuerpos contra HVB-1, y controles positivo y negativo a anticuerpos contra VDVB. Estos controles correspondieron a suero de bovino doméstico, evaluados previamente en el laboratorio de Virología de FAVET. Además, se realizó control de unidades virales, con diluciones al décimo del inóculo viral; control de título viral; y un control de viabilidad celular.

Las células fueron observadas diariamente con un microscopio óptico, esperándose el inicio de efecto citopático a las 48 horas y confirmación a las 72 horas, para VDVB y a las 24 horas, con confirmación a las 48 horas para HVB-1. La ausencia de efecto citopático en un pocillo virus-suero fue considerado como presencia de anticuerpos virales. Frente a positividad en todas las diluciones de una muestra de suero, se repitió el procedimiento de SN para esa muestra, partiendo con una dilución de suero de 1/64. El título de anticuerpos neutralizantes correspondió al recíproco de la mayor dilución del suero que protege del virus al 50% de los pocillos con monocapas celulares.

**Bioseguridad.** Se consideraron, como medidas de bioseguridad para los participantes en la toma de muestras, el uso de guantes desechables, traje clínico u overol y mascarilla, desinfección de los inmuebles empleados, eliminación del material cortante en una caja de descarte, y eliminación de la basura de peligro biológico de forma separada a la basura común. También se consideraron, como medidas de bioseguridad para los animales dentro del recinto, el uso de pediluvios y el uso no compartido de jeringas y agujas entre ellos.

Para la manipulación de los sueros y virus se respetó por parte del memorista y el personal de laboratorio de virología de FAVET, el uso de guantes desechables, delantal y cámara de flujo laminar y la desinfección por autoclave del material utilizado en los procedimientos experimentales.



## **RESULTADOS**

De un total de 112 animales analizados, 11 (9,82%) resultaron positivos a anticuerpos contra VDVB, mientras que no se obtuvieron sueros positivos a anticuerpos contra HVB-1.

Los animales seropositivos a VDVB correspondieron a 7 pudúes, 3 alpacas y 1 guanaco., correspondiendo al 87,5%, 17,6% y 33,3% del total de animales evaluados de cada especie, respectivamente (Tabla Nro. 1). Si bien, animales de las tres especies fueron analizados para la detección de anticuerpos contra VDVB en M1 y M2, la población experimentó cambios entre ambas tomas de muestras. En M1, la población de pudúes consistió de 7 ejemplares, de los cuales 6 (85,7%) presentaron anticuerpos contra VDVB. En M2, la población de pudúes consistió de 6 ejemplares, de los cuales sólo 5 permanecían desde el muestreo anterior, pues dos habían muerto, y uno consistía en un ejemplar nuevo que había nacido en el recinto. Para este muestreo (M2), 5 pudúes (83,3%) resultaron seropositivos, incluyendo al animal nuevo. El mismo animal seronegativo del muestreo 1 resultó nuevamente seronegativo en el muestreo 2.

Por su parte, tanto la población de alpacas como la de guanacos no presentaron anticuerpos en M1. Sin embargo, en M2, un guanaco presentó anticuerpos contra pestivirus, así como también, dos alpacas ya analizadas en el muestreo anterior y una nueva, que había nacido en el recinto. En relación al total de animales de cada especie presentes al momento del muestreo 2, el total de alpacas seropositivas correspondió al 21,4% (3 de 14) y de guanacos al 33,3% (1 de 3).

**Tabla Nro. 1.** Resultados obtenidos en la búsqueda de anticuerpos contra pestivirus en pudúes, alpacas y guanacos del parque zoológico Buin Zoo en los dos periodos de muestreo (M1 y M2).

Especie y N°	Sexo	Anticuerpos contra Pestivirus (título de anticuerpos)	
		M1	M2
Pudú 1	Hembra	(+) (256)	sm
Pudú 2	Macho	(+) (128)	sm
Pudú 3	Hembra	(+) (128)	(+) (90)
Pudú 4	Hembra	(+) (90)	(+) (512)
Pudú 5	Hembra	(+) (64)	(+) (181)
Pudú 6	Hembra	(+) (362)	(+) (512)
Pudú 7	Macho	sm	(+) (724)
Pudú 8	Macho	(-)	(-)
Alpaca 1	Macho	(-)	(-)
Alpaca 2	Hembra	(-)	(-)
Alpaca 3	Hembra	(-)	(-)
Alpaca 4	Macho	(-)	(+) (128)
Alpaca 5	Hembra	(-)	(-)
Alpaca 6	Macho	(-)	(-)
Alpaca 7	Hembra	(-)	(-)
Alpaca 8	Hembra	(-)	(-)
Alpaca 9	Hembra	(-)	(-)
Alpaca 10	Hembra	(-)	(+) (32)
Alpaca 11	Hembra	(-)	sm
Alpaca 12	Hembra	(-)	sm
Alpaca 13	Macho	(-)	sm
Alpaca 14	Hembra	sm	(-)
Alpaca 15	Macho	sm	(-)
Alpaca 16	Macho	sm	(-)
Alpaca 17	Macho	sm	(+) (64)
Guanaco 1	Hembra	(-)	(+) (64)
Guanaco 2	Hembra	(-)	(-)
Guanaco 3	Macho	(-)	(-)

sm : No se tiene muestra del ejemplar por no estar presente en el recinto  
 (+) : Positivo a anticuerpos  
 (-) : Negativo a anticuerpos

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de este estudio representan el primer hallazgo serológico de Pestivirus en animales de zoológico en Chile. En un trabajo anterior se buscó la presencia de anticuerpos contra VDVB y HVB-1 en cérvidos del zoológico nacional, no encontrándose seropositividad para ninguno de los dos agentes (Henríquez, 2006).

La ausencia de seropositividad a Alfaherpesvirus en los animales del PZBZ indica que sus animales no han sido expuestos a HVB-1 ni a otros Alfaherpesvirus antigénicamente relacionados. Esto respalda lo descrito en estudios anteriores que indican que HVB-1 no sería un agente infeccioso relevante en especies distintas al bovino. Aunque se reconoce que HVB-1 infecta a múltiples especies, estudios de susceptibilidad mediante inoculación experimental y análisis de transmisión en ciervo rojo (*C. elaphus*) y en renos (*R. tarandus*), muestran que la infección no causa enfermedad, no se establece latencia y no hay transmisión entre individuos, por lo que difícilmente podrían actuar como reservorio de este virus (Mollema *et al.*, 2005; Thiry *et al.*, 2006). Algunos autores sugieren que los resultados serológicos positivos a HVB-1 en múltiples especies silvestres pueden deberse a herpesvirus específicos de la especie, que están antigénicamente relacionados con el HVB-1 (Patel y Didlick, 2008; Thiry *et al.*, 2008). Así por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de anticuerpos contra HVB-1 en poblaciones de ciervos rojos y renos se debe a infección por otros Alfaherpesvirus, como herpesvirus ciervo 1 (HVC-1) y herpesvirus ciervo 2 (HVC-2), específicos para dichas especies, respectivamente (Inglis *et al.*, 1983; Ek-Kommonen *et al.*, 1986; Thiry *et al.*, 2008). Lo mismo ha ocurrido con cabras y el herpesvirus caprino 1 (HVCp-1); con búfalos y el herpesvirus búfalo 1 (HVBu-1) y con elks y el herpesvirus elk 1 (HVElk-1) (Thiry *et al.*, 2006). Es así, como actualmente en muchos análisis serológicos que buscan anticuerpos seroneutralizantes contra Alfaherpesvirus por SN se incluyen una o más de estas nuevas especies virales. La presencia de títulos de anticuerpos más altos para una especie viral en particular sugiere infección con ese Alfaherpesvirus o con uno semejante antigénicamente.

Por otro lado, el porcentaje de animales seropositivos a pestivirus en el PZBZ (9.82%) fue mayor en comparación a los resultados de Doyle & Heuschele (1983a) quienes obtuvieron un 4,3% en parques zoológicos de EEUU y a los de Probst *et al.* (2011), que obtuvieron un

1,4% en zoológicos europeos. No obstante, en estos estudios participaron múltiples parques zoológicos y no se indican los resultados de cada recinto, pudiendo existir una alta variabilidad entre los distintos parques, e incluso algunos de ellos ser seronegativos para el virus.

Dado que la principal vía de transmisión de los pestivirus es por contacto directo y los animales de zoológico se encuentran aislados y sin contacto con ganado doméstico u otras poblaciones de animales que pueden ser reservorios del VDVB, la presencia de animales seropositivos a este virus se debe al ingreso de animales seropositivos al recinto, o bien animales infectados con el virus, especialmente animales PI, quienes liberan el virus a través de todas sus secreciones y excreciones de forma prácticamente continua y de por vida (Thurmond, 2005).

Los resultados obtenidos indican que algunos animales se infectaron con el virus entre el primer y segundo muestreo, incluyendo animales seronegativos en el primer muestreo y animales nacidos posteriormente al primer muestreo. Esto permite concluir que la infección con pestivirus ocurrió dentro del recinto, y por ende, indica la presencia de uno o más animales infectados con el virus en el PZBZ.

Los animales que resultaron seropositivos se ubican en relativa cercanía, dentro del mismo sector denominado “animales chilenos”, lo cual es esperable, dadas las mayores probabilidades de una transmisión directa del virus entre los animales, debido a su poca resistencia en el medio ambiente. Llama la atención el alto porcentaje de animales seropositivos en la especie pudú. Estos animales, dentro de los evaluados, fueron los primeros en exponerse al agente infeccioso. La susceptibilidad de esta especie a pestivirus ya había sido demostrada por la presencia de anticuerpos y el aislamiento de VDVB-1 en un pudú hallado muerto en las cercanías de Chillán (Pizarro-Lucero *et al.*, 2005). En el caso de los pudúes del PZBZ, en ambos muestreos todos los animales resultaron seropositivos con excepción de un mismo ejemplar. Los pudúes seropositivos en el muestreo 1 presentaron títulos de anticuerpos a pestivirus relativamente altos (64-362), aunque en ganado doméstico, frente a infecciones recientes pueden verse títulos de anticuerpos neutralizantes mayores, de hasta 2000 ó 4000, los cuales van declinando en el tiempo, manteniéndose en torno a 100 o 200 por varios años (Fredriksen *et al.*, 1999). Sin embargo,

como se desconoce el cómo los pudúes responden humoralmente frente a la infección por pestivirus, no es posible aventurar acerca del tiempo transcurrido aproximado tras la exposición viral en estos animales. Además, se desconoce el grado de homología antigénica entre el virus que infectó a los animales y la cepa usada en el ensayo, lo que también podría disminuir los títulos reales de anticuerpos contra el virus, ya que ensayos de SN que emplean cepas virales homólogas antigénicamente al virus que infectó a los animales, permiten obtener títulos más altos que con cepas heterólogas (Saliki y Dubovi, 2004). De los seis pudúes que resultaron seropositivos en M1, cinco provienen de un criadero de Los Ángeles, Región del Bío Bío. La infección en estos animales pudo haber ocurrido tanto dentro como fuera del PZBZ. Sin embargo, el pudú seropositivo restante, sí nació en el recinto, lo que indica que su infección fue intra-zoológico, aumentando las probabilidades de que la infección en los otros cinco pudúes haya ocurrido también en ese lugar. La posibilidad de haber detectado anticuerpos calostrales en el pudú nacido en el parque, tomando como supuesto que su madre se haya infectado antes o durante su gestación, se descarta porque esta cría tenía 10 meses de edad al momento de ser muestreado en el M1, edad en la cual no es esperable que este tipo de anticuerpos esté presente. El hecho de que sólo uno de los ejemplares de pudú no presente anticuerpos, mientras que todo el resto de los animales sí tengan y en alto título, hace a este ejemplar seronegativo sospechoso de ser un animal PI. Dada la efectividad de transmisión del virus por parte de este tipo de animales, usualmente ante su presencia, todo el resto del grupo es infectado (Houe, 1995).

En el segundo muestreo, los pudúes que permanecieron en el zoológico resultaron positivos a anticuerpos contra pestivirus nuevamente, además de un ejemplar nuevo que nació en esas dependencias. El ejemplar sospechoso de ser PI volvió a resultar seronegativo, lo que aumenta las posibilidades de que se trate de un animal PI. Los títulos de anticuerpos en 3 ejemplares fueron más altos que en el muestreo anterior, entre 1 a 2 factores de dilución (90→512; 64→181; 362→512). Ya que todas las muestras de los pudúes fueron evaluadas simultáneamente, se puede descartar una diferencia leve en la concentración de virus usado en la SN como una causa de variación en los títulos, atribuyéndose tales resultados a un mayor número de anticuerpos (Brock, 1995). El aumento en los títulos de anticuerpos en los animales seropositivos del primer muestreo, pese a haber transcurrido más de un año entre un muestreo y otro, sugiere fuertemente que los animales volvieron a reinfectarse con

el virus luego del primer muestreo, indicando la circulación del virus dentro del zoológico. Esto se confirma por la presencia de anticuerpos en un ejemplar nacido luego del primer muestreo. Este animal tenía al menos un año de edad al momento de ser muestreado, por lo que no serían anticuerpos calostrales. Debido a que el virus es de baja resistencia al medio ambiente, la mantención del virus en el parque se explicaría por la presencia de animales infectados con el agente infeccioso. En esta situación, el ejemplar de pudú seronegativo resultó ser altamente sospechoso de ser un animal persistentemente infectado con VDVB u otro pestivirus. Exámenes de laboratorio son necesarios para la confirmación de este estado, lo cual requiere de la detección del virus y ausencia de anticuerpos en dos muestras del animal, tomadas con al menos 21 días de separación, con el fin de diferenciarlo de un estado de infección aguda (Larson, 2005). Para ello, se analizaron muestras de suero de este animal tomadas con 9 meses de distancia, en el laboratorio de virología de FAVET. En ambas muestras no hubo presencia de anticuerpos y fue detectado un pestivirus mediante PCR, confirmándolo como un animal PI. Para la determinación genotípica del virus se necesita realizar la secuenciación de su material genético. Dado que hasta el momento sólo VDVB estaría presente en Chile, es altamente probable de que se trate de este agente infeccioso, no obstante, la posibilidad de que sea otro pestivirus conocido, o incluso un nuevo pestivirus, no es descartable (datos por publicar).

En el segundo muestreo se observó también la presencia de anticuerpos contra VDVB en tres alpacas y un guanaco. La seroprevalencia en estas especies resultó ser acorde a una exposición al pestivirus producto de una infección aguda. Difícilmente podría haber uno o más animales PI, dada la baja cantidad de animales seropositivos. Estudios serológicos en rebaños de alpacas a nivel mundial han obtenido seroprevalencias entre 0,9 a 11,5 % (Amstel y Kennedy, 2010), con el caso excepcional de un rebaño con 85% de animales seropositivos (17 de un total de 20), en el cual se evidenció la presencia de una cría persistentemente infectada (Carman *et al.*, 2005). Estudios de seroprevalencia en alpacas de zoológicos no han sido descritos. La respuesta serológica de esta especie frente a una infección aguda con VDVB es más baja que el ganado doméstico, en términos de diseminación y generación de títulos de anticuerpos (Amstel y Kennedy, 2010), los cuales han sido reportados entre 20 a 480 (Foster *et al.*, 2007). Los títulos obtenidos por alpacas del PZBZ se encuentran cercanos al límite inferior de ese rango.

Por otro lado, los resultados de este estudio son el primer hallazgo serológico de pestivirus en guanacos. Previamente se han realizado búsquedas serológicas en poblaciones silvestres y cautivas de esta especie en Chile y Argentina, no obteniéndose animales seropositivos (Celedón *et al.*, 2001; Karesh *et al.*, 1998; Marcoppido *et al.*, 2011).

La presencia de anticuerpos en dos alpacas y un guanaco que habían resultado seronegativos en el primer muestreo y en una alpaca nacida en el recinto, demuestra que la infección en este grupo fue intra-zoológico. Llamas, guanacos y alpacas se encuentran en jaulas continuas, alineadas en dicho orden, pudiendo haber contacto entre ellos. Por otro lado, la jaula de los pudúes se encuentra en relativa cercanía a la jaula de alpacas (Figura. Nro 1, Anexo). El número de individuos seropositivos en los camélidos, en términos ordinales, coincide con la proximidad a los pudúes. Dada la ubicación de estas especies y la presencia de un animal PI, es posible que la infección de los camélidos haya tenido su origen desde los pudúes. Los animales PI al estar liberando grandes cantidades del virus contaminan el ambiente, pudiendo haber transmisión por fomites e incluso por aerosoles. La transmisión a través del aire puede ocurrir dentro de las instalaciones y las herramientas y equipos usados en animales PI y en corrales donde animales PI han estado habitando pueden, por un periodo limitado de tiempo, llevar consigo una dosis suficiente de virus viable para que otros animales susceptibles se infecten y seroconviertan (Lang-Ree *et al.*, 1994; Mars *et al.*, 1999; Niskanen y Lindberg, 2003; Lindberg *et al.*, 2004). Se ha demostrado infección cuando animales han estado en proximidad a un PI a distancias de 1 y 10 metros (Niskanen y Lindberg, 2003). También se ha descrito la potencial transmisión por parte de insectos, habiéndose aislado el virus desde mosca de la cara (*Musca autumnalis*), las cuales se alimentaban en la nariz y cara de un animal PI (Gunn, 1993). Además, se ha demostrado experimentalmente la transmisión del VDVB por la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*), la mosca del caballo (*Haematopota pluvialis*), y la mosca de la cabeza (*Hydrotea irritans*) desde un animal PI a terneros y ovejas (Tarry *et al.*, 1991). Sin embargo, otra fuente de infección no es descartable. En el PZBZ, parte del manejo habitual de las alpacas es mantenerlas junto a otros animales domésticos durante un período de su vida, en un sector denominado Baby Zoo, el cual corresponde a una granja educativa o petting zoo. El estatus sanitario respecto a pestivirus de esos animales domésticos se desconoce, ya que no fueron analizados en este estudio.

Aunque hubo infección con pestivirus en alpacas y guanacos dentro del recinto, la información registrada en las fichas clínicas no indica signos clínicos acordes a una infección con VDVB u otro pestivirus durante el tiempo en que pudo ocurrir la infección, aunque no es descartable que pueda haber pasado desapercibida. La infección aguda de VDVB en camélidos sudamericanos es casi indetectable, excepto por signos vagos de enfermedad como anorexia y letargia (Amstel y Kennedy, 2010). Las alpacas, tras la infección con VDVB, desarrollan una enfermedad más leve en comparación a los bovinos. Esto puede deberse a que existe una permisividad limitada de las células de alpaca al VDVB en comparación a las células de bovino (Samson *et al.*, 2011).

Los pudúes por su parte, tampoco evidenciaron signos clínicos durante el período de estudio, no obstante presentan un historial de varias muertes de causa desconocida y abortos en el recinto. Se desconoce la susceptibilidad de esta especie a enfermarse por VDVB u otros pestivirus. El animal encontrado en Chillán, mostró lesiones ulcerativas en la nariz, boca, mucosa gingival, espacios interdigitales y esófago, las cuales son acordes a una infección por VDVB (Pizarro-Lucero *et al.*, 2005). El grado de las lesiones era más sugerente a enfermedad de mucosa, sin embargo, no fue aislada una cepa citopática, por lo que sólo se entenderían estos hallazgos por una infección aguda severa. Aunque no es posible asegurar que este animal murió a causa del VDVB, éste al menos fue un factor predisponente. En el PZBZ, tres pudúes evaluados en este estudio murieron, dos antes del segundo muestreo y uno días después de este. Otro ejemplar de esta especie nació y murió entre ambos muestreos, por lo que no fue incluido en el estudio. Las causas de muerte se desconocen y sólo en uno fue realizada una necropsia, no presentando lesiones acorde a VDVB. Por otra parte, dos abortos, ocurridos en el año 2009 y 2010, mediante análisis patológico, fueron sugerentes de una causa infecciosa. Un feto presentaba hidrocefalia y el otro presentaba cataratas, ambas malformaciones descritas para VDVB, lo que hace sospechar a este virus como causante de dichos abortos, sin embargo no fue confirmado mediante análisis virológico<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> Información obtenida por revisión de fichas clínicas, informes de exámenes patológicos y antecedentes presentes en el Parque Zoológico Buin Zoo.



El pudú PI del PZBZ nació en el zoológico el año 2010 y curiosamente no ha presentado complicaciones sanitarias. Los bovinos PI, usualmente nacen débiles, con retraso en el crecimiento y mueren poco después del nacimiento (Baker, 1995). Estos animales tienen un 50 % más de riesgo de morir o ser sacrificados antes del primer año de vida debido a que se enferman con mayor frecuencia que el resto de su grupo (Houe, 1993). No obstante, un bovino PI es posible que pueda alcanzar la edad reproductiva sin complicaciones (Lindberg, 2003). También se ha diagnosticado el estado de PI en ciervos ratón de Java en zoológicos, los cuales tampoco presentaban problemas clínicos (Grøndahl *et al.*, 2003).

La identificación de los animales del parque es realizada meses después de su nacimiento mediante chip subcutáneo, por lo que en la mayoría de ellos no se registra cual es la identificación de sus padres. Por esta razón, se desconoce quién es la madre del pudú PI y la procedencia de esta, información necesaria para saber dónde ocurrió la infección del feto. Una de las hembras evaluadas ingresó al recinto a fines del año 2010 en estado de gravidez, proveniente del criadero de Los Ángeles. Si esta hembra fuese la madre del ejemplar PI, existe posibilidad de que la infección ocurrió en aquel establecimiento. El aborto registrado el año 2009, sin embargo, puede ser un indicio de que el pestivirus ha estado en el PZBZ antes del año 2010.

Mediante el presente estudio se puede concluir que los pudúes tienen una alta susceptibilidad a pestivirus, dado que todo animal que estuvo presente junto al ejemplar PI se infectó con el virus. Por otra parte, la detección del estado de persistentemente infectado en un individuo de esta especie establece un nuevo precedente respecto a la epidemiología de los pestivirus, ya que esta especie podría actuar como reservorio del virus. Futuros estudios deben ser realizados para comprender mejor este aspecto, así como también, para conocer el rol del VDVB u otros pestivirus como agente patógeno en los pudúes. La infección demostrada en este estudio, junto con el historial de abortos registrados en el PZBZ son sugerentes de que los pudúes podrían verse afectados, al menos en términos reproductivos, por pestivirus. Estos agentes infecciosos podrían ser una amenaza en planes de conservación de esta especie, catalogada en estado vulnerable.

Respecto a la situación en el PZBZ, la infección por pestivirus junto con la presencia de un animal PI, hacen necesario el establecimiento de algunas medidas de control y prevención para evitar el ingreso y transmisión del virus entre los animales del recinto. La medida de control principal en este tipo de casos es el retiro o eliminación de todo animal PI, acción que debe hacerse con el pudú diagnosticado como tal. Es recomendable también, analizar mediante estudios virológicos, a todos los ejemplares de pudú que nacieron mientras el ejemplar PI estuvo presente, así como también a alpacas y guanacos que hayan nacido durante el periodo del presente estudio, para así descartar la presencia de otros animales PI. Los animales domésticos presentes en el PZBZ también debieran ser evaluados para eliminar posibles animales PI, e idealmente, establecer medidas de bioseguridad que garanticen la efectiva separación entre los animales domésticos susceptibles a la infección con este virus y los animales silvestres cautivos. Como medida preventiva a futuras infecciones, es recomendable la incorporación de este agente infeccioso al análisis rutinario de ungulados nuevos que lleguen al recinto. El establecimiento de protocolos de vacunación en los animales del zoológico, aunque es una opción factible, puede no ser muy útil. De los dos tipos de vacunas existentes para VDVB, las de virus vivo modificado y las inactivadas, sólo estas últimas están autorizadas por el SAG en Chile. Pese a ser más seguras que las vivas modificadas, con las cuales hay riesgo de reversión de la virulencia en animales sometidos a factores estresantes, las vacunas inactivadas son menos efectivas debido a que tienen una menor reactividad cruzada a las diversas cepas del virus, desarrollando una débil respuesta de anticuerpos frente a cepas heterólogas (Kalaycioglu, 2007). Si a esto se le suma el hecho de que existe una alta heterogeneidad antigénica entre las cepas de VDVB circulantes en el país (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006), la vacunación en los animales del zoológico podría no ser protectora. Debido a que el ingreso del virus al recinto sólo puede ocurrir a través de animales infecciosos, una adecuada evaluación a través de procedimientos cuarentenarios y análisis de laboratorio a todo animal susceptible que llegue al parque por primera vez, es suficiente para su prevención.

## BIBLIOGRAFÍA

- **AGUIRRE, A.; HANSEN, D.; STARKEY, E.; MCLEAN, R.** 1995. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. *Prev Vet Med.* 21: 313-322.
- **AMSTEL, S.; KENNEDY, M.** 2010. Bovine viral diarrhea infections in new world camelids - A review. *Small Ruminant Res.* 91:121-126.
- **BAKER, J.** 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11:425-445.
- **BORCHERS, K.; BRACKMANN, J.; WOLF, O.; RUDOLPH, M.; GLATZEL, P.; KRASINSKA, M.; KRASINSKI, Z.; FRÖLICH, K.** 2002. Virologic investigations of free-living European bison (*Bison bonasus*) from the Bialowieza Primeval Forest, Poland. *J Wildl Dis.* 38(3):533-538.
- **BROCK, K.** 1995. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11:549-561.
- **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(6):589-93.
- **CELEDÓN, M.; VARGAS, C.; SALINAS, A.; CASANOVA, A.; IBARRA, L.; BERRÍOS, P.** 1996. Prevalencias serológicas para el virus 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.; 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(2):165-172.
- **CHOW, T.; DAVIS, R.** 1964. The susceptibility of mule deer to infectious bovine rhinotracheitis. *Am J Vet Res.* 25:518-519.
- **DOYLE, L.; HEUSCHELE, W.** 1983a. Bovine viral diarrhea virus infection in captive exotic ruminants. *J Am Vet Med Assoc.* 183:1257-1259.
- **DOYLE, L.; HEUSCHELE, W.** 1983b. Prevalence of antibody to bovine herpesvirus 1 in wild ruminants captive in United States zoos. *J Am Vet Med Assoc.* 183:1255-1256.
- **DUNCAN, C.; VAN CAMPEN, H.; SOTO, S.; LEVAN, I.; BAETEN, L.; MILLER, M.** 2008. Persistent Bovine viral diarrhea virus infection in wild cervids of Colorado. *J Vet Diagn Invest.* 20: 650–653.

- **EK-KOMMONEN, C.; PELKONEN, S.; NETTLETON, P.** 1986. Isolation of a herpesvirus serologically related to bovine herpesvirus 1 from a reindeer (*Rangifer tarandus*). Acta Vet Scand. 27:299–301.
- **ELAZHARY, M.; FRECHETTE, J.; SILIM, A.; ROY, R.** 1981. Serological evidence of some bovine viruses in the caribou (*Rangifer tarandus caribou*) in Quebec. J Wildl Dis. 17(4):609-612.
- **FOSTER, A.; HOULIHAN, M.; HOLMES, J.; WATT, E.; HIGGENS, R.; ERRINGTON, J.; IBATA, G.; WAKELEY, P.** 2007. Bovine viral diarrhoea virus infection of alpacas (*Vicugna pacos*) in the UK. Vet Rec. 161:94–99.
- **FREDRIKSEN, B.; SANDVIK, T.; LØKEN, T.; ODEGAARD, S.** 1999. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. Vet Rec. 144 (5):111-114.
- **FRÖLICH, K.; HAMBLIN, C.; PARIDA, S.; TUPPURAINEN, E.; SCHETTLER, E.** 2006. Serological survey for potential disease agents of free-ranging cervids in six selected national parks from Germany. J Wildl Dis. 42(4):836-843.
- **GAO, S.; LUO, J.; DU, J.; LANG, Y.; CONG, G.; SHAO, J.; LIN, T.; ZHAO, F.; BELÁK, S.; LIU, L.; CHANG, H.; YIN, H.** 2013. Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus in Western China. Vet Microbiol. 163(1-2):172-176.
- **GRØNDAHL, C.; UTTENTHAL, A.; HOUE, H.; RASMUSSEN, T.; HOYER, M.; LARSEN, L.** 2003. Characterisation of a pestivirus isolated from persistently infected mousedeer (*Tragulus javanicus*). Arch Virol. 148(8):1455-1463.
- **GROOMS, D.** 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin Food Anim. 20: 5–19.
- **GUNN, H.** 1993. Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. Vet Rec. 132:584-585.
- **HEDGER, R.; HAMBLIN, C.** 1978. Neutralizing antibodies to bovid herpes virus 1 (infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvo-vaginitis) in African wildlife with special reference to the cape buffalo (*Syncerus caffer*). J Comp Pathol. 88(2):211-8.
- **HENRIQUEZ, A.** 2006. Pesquisa de anticuerpos contra virus diarrea viral bovina, parainfluenza 3 y herpesvirus bovino – 1 en cérvidos del Zoológico Nacional. Memoria Titulo Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Mayor. Fac. Cs. Silvoagropecuarias. 162 p.
- **HOUE, H.** 1993. Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). Prev Vet Med. 15:275-283.
- **HOUE, H.** 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 11:521-547.

- **INGLIS, D.; BOWIE, J.; ALLAN, M.; NETTLETON, P.** 1983. Ocular disease in red deer calves associated with a herpesvirus-infection. *Vet. Rec.* 113:182–183.
- **KALAYCIOGLU, A.** 2007. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination. A review. *Vet Q.* 29(2):60-67.
- **KÁLMÁN, D.; EGYED, L.** 2005. PCR detection of bovine herpesviruses from nonbovine ruminants in Hungary. *J Wildl Dis.* 41(3):482-488.
- **KARESH, W.; UHART, M.; DIERENFELD, E.; BRASELTON, W.; TORRES, A.; HOUSE, C.; PUCHE, H.; COOK, R.** 1998. Health evaluation of free-ranging guanaco (*Lama guanicoe*). *J Zoo Wildl Med.* 29(2):134-41.
- **KAUTTO, A.; ALENIUS, S.; MOSSING, T.; BECHER, P.; BELÁK, S.; LARSKA, M.** 2012. Pestivirus and alphaherpesvirus infections in Swedish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.). *Vet Microbiol.* 156(1-2):64-71.
- **LAMONTAGNE, L.; SADI, L.; JOYAL, R.** 1989. Serological evidence of bovine herpesvirus 1-related virus infection in the white-tailed deer population on Anticosti Island, Quebec. *J Wildl Dis.* 25(2):202-205.
- **LANG-REE, J.; VATN, T.; KOMMISRUUD, E.; LOKEN, T.** 1994. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. *Vet Rec.* 135(17):412-413.
- **LARSON, R.** 2005. Management systems and control programs. **In:** Goyal, M.; Ridpath, J. *BVDV: Diagnosis, Management, and Control.* Iowa, USA. pp 91 – 104.
- **LILLEHAUG, A.; VIKØREN, T.; LARSEN, I.; AKERSTEDT, J.; THARALDSEN, J.; HANDELAND, K.** 2003. Antibodies to ruminant alphaherpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervids. *J Wildl Dis.* 39(4):779-786.
- **LINDBERG, A.** 2003. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. *Vet Q.* 25(1):1-16.
- **LINDBERG, A.; STOKSTAD, M.; LOKEN, T.; ALENIUS, S.; NISKANEN, R.** 2004. Indirect transmission of bovine viral diarrhoea virus at calving and during the postparturient period. *Vet Rec.* 154:463-467.
- **MARCOPPIDO, G.; PARREÑO, V.; VILÁ, B.** 2010. Antibodies to pathogenic livestock viruses in a wild vicuña (*Vicugna vicugna*) population in the Argentinean Andean altiplano. *J Wildl Dis.* 46(2):608-14.
- **MARCOPPIDO, G.; OLIVERA, V.; BOK, K.; PARREÑO, V.** 2011. Study of the kinetics of antibodies titres against viral pathogens and detection of rotavirus and parainfluenza 3 infections in captive crias of guanacos (*Lama guanicoe*). *Transboundary and Emerging Diseases.* 58(1):37-43.

- **MARS, M.; BRUSCHKE, C.; OIRSCHOT, J.** 1999. Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet Microbiol.* 66:197-207.
- **MOLLEMA, L.; RIJSEWIJK, F.; NODELIJK, G.; DE JONG, M.** 2005. Quantification of the transmission of bovine herpesvirus 1 among red deer (*Cervus elaphus*) under experimental conditions. *Vet Microbiol.* 111(1-2):25-34.
- **MORÁN, P.; DI SANTO, M.; BECALUBA, H.; GOGORZA, L.** 2010. Detección de anticuerpos para BVDV y BoHV-1 en llamas de la región de Tandil - Provincia de Buenos Aires. *InVet.* 12(2): 131-137.
- **MUSHI, E.; KARSTAD, L.** 1979. Experimental infection of wildebeest with the herpesvirus of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. *J Wildl Dis.* 15(4):579-583.
- **MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E.** 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res.* 38(2):181-209.
- **NEGRÓN, M.; POGRANICHNIY, R.; VAN ALSTINE, W.; HILTON, W.; LÉVY, M.; RAIZMAN, E.** 2012. Evaluation of horizontal transmission of bovine viral diarrhoea virus type 1a from experimentally infected white-tailed deer fawns (*Odocoileus virginianus*) to colostrum-deprived calves. *Am J Vet Res.* 73(2):257-262.
- **NELSON, D.; DARK, M.; BRADWAY, D.; RIDPATH, J.; CALL, N.; HARUNA, J.; RURANGIRWA, F.; EVERMANN, J.** 2008. Evidence for persistent bovine viral diarrhoea virus infection in a captive mountain goat (*Oreamnos americanus*). *J Vet Diagn Invest.* 20:752-759.
- **NETTLETON, P.; THIRY, E.; REID, H.; PASTORET, P.** 1988. Herpesvirus infections in Cervidae. *Rev sci tech Off int Epiz.* 7(4):977-988.
- **NISKANEN, R.; LINDBERG, A.** 2003. Transmission of Bovine Viral Diarrhoea Virus by Unhygienic Vaccination Procedures, Ambient Air, and from Contaminated Pens. *Vet J.* 165:125-130.
- **OIE.** 2010. Manual of Standards for Diagnostics Tests and Vaccines. [en línea] < [http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health\\_standards/tahm/2.04.13\\_ibr\\_ipv.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahm/2.04.13_ibr_ipv.pdf) > [consulta: 27- 10-2012]
- **PASSLER, T.; WALZ, P.** 2009. Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. *Anim Health Res Rev.* 11(2):191-205.
- **PASSLER, T.; WALZ, P.; DITCHKOFF, S.; BROCK, K.; DEYOUNG, R.; FOLEY, A.; GIVENS, M.** 2009. Cohabitation of pregnant white-tailed deer and cattle persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus results in persistently infected fawns. *Vet Microbiol.* 134:362-367.

- **PASSLER, T.; DITCHKOFF, S.; GIVENS, M.; BROCK, K.; DEYOUNG, R.; WALZ, P.** 2010. Transmission of bovine viral diarrhoea virus among white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet Res.* 41(2):20.
- **PATEL, J.; DIDLICK, S.** 2008. Epidemiology, disease and control of infections in ruminants by herpesviruses - an overview. *J S Afr Vet Assoc.* 79(1):8-14.
- **PIZARRO-LUCERO, J.; CELEDÓN, M.; NAVARRO, C.; ORTEGA, R.; GONZÁLEZ, D.** 2005. Identification of a pestivirus isolated from a freeranging pudu (*Pudu puda*) in Chile. *Vet Rec.* 157:292-294.
- **PIZARRO-LUCERO, J., CELEDÓN, M.; AGUILERA, M.; DE CALISTO, A.** 2006. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet Microbiol.* 115(1):208-217.
- **PROBST, C.; SPECK, S.; HOFER, H.** 2011. Serosurvey of zoo ungulates in central Europe. *Int Zoo Yb.* 45:168-182.
- **PUCK, T.; CIENVRA, S.; ROBINSON, A.** 1961. Genetic of somatic mammalian cells. *J Exp Med.* 33:339-349.
- **RAMPTON, C.; JESSETT, D.** 1976. The prevalence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus in some game animals of East Africa. *J Wildl Dis.* 12(1):2-6.
- **REED, J.; MUENCH, H.** 1938. A simple method of estimating fifty – percent endpoints. *Am J Hyg.* 27:493-497.
- **RIDPATH, J.; DRISKELL, E.; CHASE, C.; NEILL, J.; PALMER, M.; BRODERSEN, B.** 2008. Reproductive tract disease associated with inoculation of pregnant white-tailed deer with bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res.* 69: 1630-1636.
- **RIDPATH J.** 2010. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 26(2):335-348.
- **SAG.** 2013. Lista de enfermedades de denuncia obligatoria (EDO) al SAG. [en línea] <[http://www.sag.cl/sites/default/files/lista\\_enfermedades\\_notificables\\_mayo-2013.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/lista_enfermedades_notificables_mayo-2013.pdf)> [consulta: 06- 06-2013]
- **SALIKI, J.; DUBOVI, E.** 2004. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20(1):69-83.
- **SAMSON, H.; TOPLIFF, C.; DONIS, R.; KELLING, C.** 2011. Comparison of viral replication and IFN response in alpaca and bovine cells following bovine viral diarrhoea virus infection. *Virology.* 413(1):111-117.
- **SCICLUNA, M.; CAPRIOLI, A.; SARALLI, G.; MANNA, G.; BARONE, A.; CERSINI, A.; CARDETI, G.; CONDOLEO, R.; AUTORINO, G.** 2010. Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of Bovine Herpesvirus 1 infection? *Vet Microbiol.* 143(1):81-88.

- **SIMPSON, V.** 2002. Wild Animals as Reservoirs of Infectious Diseases in the UK. *Vet J.* 163:128-146.
- **TARRY, D.; BERNAL, L.; EDWARDS, S.** 1991. Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Vet Rec.* 128:82-84.
- **THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E.** 2006. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet Res.* 37(2):169-190.
- **THIRY, J.; MUYLKENS, B.; THIRY, E.** 2008. Infectious bovine rhinotracheitis and the epidemiological role of the other ruminant species. *Hung Vet J.* 130:116-123.
- **THURMOND, M.** 2005. Virus transmission. **In:** Goyal, M.; Ridpath, J. *BVDV: Diagnosis, Management, and Control.* Iowa, USA. pp 91 – 104.
- **TRYLAND, M.; MØRK, T.; RYENG, K.; SØRENSEN, K.** 2005. Evidence of parapox-, alphaherpes- and pestivirus infections in carcasses of semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) from Finnmark, Norway. *Rangifer.* 25(2):75-83.
- **VAN CAMPEN, H.; RIDPATH, J.; WILLIAMS, E.; CAVENDER, J.; EDWARDS, J.; SMITH, S.; SAWYER, H.** 2001. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *J Wildl Dis.* 37(2):306-311.
- **VILCEK, S.; NETTLETON, P.** 2006. Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol.* 116:1-12.
- **WALZ, P.; GROOMS, D.; PASSLER, T.; RIDPATH, J.; TREMBLAY, R.; STEP, D.; CALLAN, R.; GIVENS, M.** 2010. Control of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Ruminants. *J Vet Intern Med.* 24:476-486.
- **WERNERY, U.** 2012. Bovine viral diarrhoea-an emerging disease in camelids a review. *Am J Virol.* 1 (1):9-17.



## ANEXO



**Figura Nro. 1. Foto satelital del Parque Zoológico Buin Zoo.**

Se delimita el parque con líneas rojas y se muestra la ubicación de alpacas (A), guanacos (G), llamas (L) y pudúes (P) dentro del recinto. Fuente: Google maps ©2013