



UNIVERSIDAD DE CHILE

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



**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS PARA EL VIRUS DIARREA
VIRAL BOVINA EN SUEROS DE VICUÑAS DE LA REGIÓN
DE TARAPACÁ**

NATALIA ANDREA ZENTENO VARGAS

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

PROFESOR GUÍA: MARÍA ORFELIA CELEDÓN VENEGAS

**SANTIAGO, CHILE
2007**



UNIVERSIDAD DE CHILE

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



**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS PARA EL VIRUS DIARREA
VIRAL BOVINA EN SUEROS DE VICUÑAS DE LA REGIÓN
DE TARAPACÁ**

NATALIA ANDREA ZENTENO VARGAS

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

NOTA FINAL:

PROFESOR GUÍA: MARÍA O. CELEDÓN V.

PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ PIZARRO L.

PROFESOR CONSEJERO: VICTOR H. PARRAGUEZ G.

SANTIAGO, CHILE

2007

ÍNDICE

ÍNDICE	0
RESUMEN	1
	Error! Marcador no definido.
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
1. Camélidos Sudamericanos	6
2. La Vicuña	8
3. Pestivirus.....	10
4. Patogenia del virus Diarrea Viral Bovina	16
5. Respuesta Inmune	18
6. Diagnóstico	20
7. Virus Diarrea Viral Bovina en camélidos	21
8. Infección por pestivirus en Chile	22
OBJETIVOS	25
1. Objetivo General	25
2. Objetivo Específico.....	25
MATERIAL Y MÉTODO	26
1. Muestras	26
2. Virus.....	27
3. Obtención de células de pulmón fetal bovino	27
4. Congelación de células de pulmón fetal bovino	28
5. Descongelación de células de pulmón fetal bovino	28
6. Prueba de Inmunofluorescencia Directa.....	29
7. Titulación Viral.....	30
8. Seroneutralización.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
CONCLUSIÓN	36
BIBLIOGRAFÍA	37

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes para el virus diarrea viral bovina (VDVB) en sueros de vicuñas de la Región de Tarapacá de Chile.

Asumiendo que el 3,5% de las vicuñas del altiplano chileno, poseen anticuerpos neutralizantes para el VDVB, se obtuvo un total de 90 muestras de sueros de vicuñas durante el año 2005, de las localidades de Caquena y Chislluma, comuna de Putre y General Lagos, respectivamente, Provincia de Parinacota, Región de Tarapacá. La detección de anticuerpos neutralizantes se realizó mediante la prueba de seroneutralización (SN), en donde se enfrentaron diluciones del suero de vicuñas, en base dos, con 100 dosis infectantes cultivo de tejido 50% (DICT50) de la cepa de referencia NADL del VDVB.

En ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes para el VDVB o para algún otro virus antigénicamente relacionado.

Los resultados permiten concluir que menos del 3,5% de las vicuñas de las localidades estudiadas, podrían estar infectadas por un pestivirus que comparte antígenos comunes con la cepa de referencia NADL del VDVB.

SUMMARY

The aim of this study was to detect the presence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) neutralizing antibodies in vicugna's sera from the Tarapacá Region of Chile.

It was assumed that 3.5% of the vicuñas from the Chilean altiplano has BVDV neutralizing antibodies. 90 serum samples were collected in 2005 from Caquena and Chislluma, Putre and General Lagos County respectively, Province of Parinacota, Tarapacá Region. Seroneutralization test (SN) was used to detect neutralizing antibodies. Each serum dilution was confronted to 100 tissue infected doses 50% (TCID50%) of the NADL reference BVDV strain.

In none of the analyzed samples neutralizing antibodies were detected for BVDV or any other related virus antigen.

Results permit to conclude that less than 3.5% of the vicuñas from the sampled locations might be infected with a pestivirus sharing common antigens with the NADL reference BVDV strain.

INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos (CSA) han sido y siguen siendo el sustento de la economía de las poblaciones que habitan el altiplano de Sudamérica.

La ganadería de camélidos es una actividad agraria que ha estado presente de manera tradicional en algunas zonas del país, en particular en la Región de Tarapacá y, secundariamente, en la Región de Antofagasta, lugares donde se concentran las mayores proporciones de la población nacional de especies de CSA domésticos, llama (*Lama glama*) y alpaca (*Lama pacos*). En los últimos años, se han desarrollado esfuerzos por introducir e impulsar estas ganaderías, en particular la de alpacas, en otras regiones del país, como las de O'Higgins, El Maule y La Araucanía.

En cuanto a los camélidos silvestres, vicuña (*Vicugna vicugna*) y guanaco (*Lama guanicoe*), una gran proporción de las vicuñas existentes en el país se localizan también en la Región de Tarapacá, especialmente en parques y reservas nacionales, en tanto que la Región de Magallanes concentra el mayor número de guanacos existentes en Chile.

Se estima que en el siglo XVI las vicuñas superaban varios millones. A partir de la conquista española, los cambios demográficos en el Norte Grande de Chile fueron contrastantes; así durante las primeras incursiones españolas, la población humana apenas superaba los 34.000 habitantes. Con el advenimiento de la minería no metálica esta situación cambió radicalmente y como consecuencia, en 1885 ya existían en el Norte Grande cerca de 550.000 habitantes, quienes para 1920 sobrepasaban la barrera del millón. Dicha actividad fomentó la caza deportiva, lo que impactó seriamente a la fauna nativa, junto con el interés comercial por la fibra de vicuña, por lo que se estima que a comienzos

de la década del 50, las poblaciones habían decaído a unos 400.000 ejemplares (Koford, 1957) y, a fines de los años 60, a 2.000 distribuidos entre Bolivia, Chile y Argentina y, entre 5.000 y 10.000 en Perú (Rabinovich *et al.*, 1991).

En síntesis, tanto la necesidad de alimentar, dar recreo y sustento a la población asociada a la minería no metálica, como el interés comercial por la fibra de vicuña y falta de custodia estatal de los recursos andinos, transforman las primeras décadas de 1900, en uno de los fenómenos de degradación más importantes de la historia ecológica de Chile, alcanzándose el clímax a fines de los años 60.

Desde la década de los 70 y hasta la actualidad, se han puesto en marcha un conjunto de acciones nacionales e internacionales de conservación y protección de la vicuña, siendo la Corporación Nacional Forestal (CONAF) y el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) las principales entidades chilenas encargadas de desarrollar éstas actividades.

Para las distintas zonas del territorio nacional, las diversas especies de camélidos presentan oportunidades de desarrollo mediante la obtención de un conjunto de productos, como la fibra, carne y cuero. Algunos de ellos muestran excelentes perspectivas de mercado, especialmente en el exterior. Asimismo, en algunas áreas geográficas 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. Es por esto, que surge la necesidad de mantener y resguardar el patrimonio sanitario de estas especies, ya que las poblaciones son bastante reducidas, y en especial la de la vicuña que se vio enfrentada por años a la sobreexplotación.

Las diversas especies de camélidos pueden verse afectadas por distintas patologías que podrían alterar sus parámetros reproductivos y productivos, como son algunas enfermedades virales que afectan a los rumiantes y que se

encuentran dentro del género pestivirus. Dentro de éstas, el patógeno más importante para la producción bovina es el virus de la diarrea viral bovina (VDVB). Este virus está ampliamente diseminado y se caracteriza principalmente por producir pérdidas reproductivas asociadas a baja fertilidad, mortalidad embrionaria, fetal, perinatal y aborto. Además, sus manifestaciones clínicas se expresan también a nivel respiratorio, gastrointestinal, inmunológico y en el sistema nervioso central.

La escasa información en relación a las enfermedades virales que podrían afectar a los CSA, sugiere que son susceptibles de hacer infección tanto con patógenos para su especie como también de otras, fundamentalmente rumiantes, con presentación de enfermedad clínica y/o subclínica.

Existen estudios de distintas zonas del país que demuestran que los pestivirus infectan a diferentes especies animales pertenecientes a los rumiantes. En la especie bovina y ovina la infección por pestivirus está altamente diseminada con altas prevalencias de anticuerpos. En Chile, se han detectado anticuerpos contra pestivirus en bovinos, ovinos, caprinos y CSA de diferentes regiones pero se desconoce si el ganado doméstico y silvestre de la Región de Tarapacá y en particular del altiplano chileno está infectado con pestivirus.

La presencia de antecedentes clínicos, como son la baja fertilidad y natalidad de los rebaños y la presencia de serorreaccionantes en ganado del altiplano de Perú hace sospechar de su presencia, así como también, el hecho de que estos animales tienen contacto con alpacas, llamas y ovinos pudiendo contagiarse a partir de estos si es que estuviesen infectados.

El objetivo de este estudio es detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes para el VDVB bovino, en vicuñas de la zona altiplánica de nuestro país.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Camélidos Sudamericanos

Los CSA son una riqueza pecuaria y genética de las poblaciones andinas (FAO, 2005).

La población actual de CSA, en los países latinoamericanos que incluyen: Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay y Perú, corresponde a 6.935.441. En Chile existe un total de 229.038 ejemplares, de los cuales: 79.294 corresponden a llamas; 45.224 a alpacas; 25.000 a vicuñas; y una población de guanacos estimada por el SAG de entre 73.000 a 86.000 ejemplares (FAO, 2005).

Respecto a la distribución de CSA domésticos en Chile, se observa que el mayor número de animales se concentra en la Región de Tarapacá, con un 89,20 % del total de alpacas y un 90, 20 % de llamas. En el resto de las regiones los porcentajes, en todos los casos, no superan el 2% de la participación total, excepto la Región de Antofagasta que posee un 6,86% de las llamas. De lo anterior se puede concluir que prácticamente todo el ganado camélido doméstico del país se encuentra en manos de los campesinos aymaras que habitan las dos regiones mencionadas. De la misma forma, la totalidad de la población de vicuñas se distribuye en el ecosistema de puna, compitiendo con alpacas y llamas en la obtención de sus recursos nutricionales, sólo el guanaco se demuestra como una especie más cosmopolita, distribuyéndose naturalmente a través de todo el territorio nacional, aún cuando la mayor parte de los individuos se concentra significativamente en la Región de Magallanes y de la Antártica Chilena (FAO, 2005).

La participación porcentual de los CSA domésticos en la masa de ganado existente en Chile, es apenas un 1% del total (INE, 1997). A pesar de lo anterior, los CSA domésticos constituyen el principal recurso para las familias aymaras que

habitan en el altiplano de la Región de Tarapacá y difícilmente podrán ser reemplazados por otras especies domésticas, las que habitualmente no se aclimatan, ni menos se adaptan a las condiciones extremas del altiplano. La única especie que ha mostrado una aclimatación al ambiente de la puna es el ovino, aunque con un grado de eficiencia productiva bajo respecto de lo observado para la especie en otras regiones del país (FAO, 2005).

Al considerar el porcentaje de animales faenados, los CSA domésticos, alcanzan solamente el 0,15% del total nacional, el cual a pesar de ser bajo, supera al beneficio de ganado caprino (0,08%). Al analizar sólo las cifras de animales beneficiados en los mataderos de Arica y sin considerar el beneficio informal de ninguna especie, los CSA alcanzan un 60,78%, superando incluso a la suma de bovinos, ovinos y porcinos (Raggi, 2000).

La producción de fibra, fundamentalmente la de alpaca, posee una alta valoración en los mercados internacionales por su fina textura. Sin embargo, representa sólo el 2,5% del total mundial de exportación de fibras de origen animal (Raggi, 2000). En Chile, la obtención de vellón se realiza cada dos y hasta tres años con el uso de herramientas muy rudimentarias y su exportación no ascendería a niveles superiores a las 30 toneladas anuales, constituidas por fibras sucias, donde se encuentran mezcladas las de llamas y alpacas, separadas solamente por sus colores (Raggi, 2000).

El mercado de la fibra es inestable, con amplias fluctuaciones de precio y volúmenes de producción. Muy poco se ha hecho con relación a las tecnologías de producción y al mejoramiento de la fibra. La mayor parte de los avances se han realizado en el procesamiento textil y en las tecnologías de tratamiento de la fibra (FAO, 2005).

2. La Vicuña

En el extremo norte de nuestro país se concentra la mayor cantidad de vicuñas y un número indeterminado de guanacos. Sin embargo ambas especies habitan sectores diferentes, encontrándose la vicuña a lo largo del ecosistema de puna andina (pastizales de baja productividad), a altitudes entre 3.000 y 4.600 m.s.n.m., desde el límite administrativo con Perú, hasta el límite sur del altiplano de la Región de Atacama (27°30'S), concentrándose un 96.93% de su población en la Región de Tarapacá (Torres, 1992).

Tradicionalmente, en el género *Vicugna* se ha incluido una especie: *V. vicugna*, con dos subespecies: *vicugna* (Molina, 1872) y *mensalis* (Thomas, 1917), vicuña austral y del norte, respectivamente. La distribución espacial de las subespecies es fraccionada y heterogénea: *V.v. mensalis* se encuentra en la Región de Tarapacá, provincia de Parinacota (18°45'S, hasta 19°00'S, aproximadamente) y *V.v. vicugna* desde ese límite sur, correspondiente a la provincia de Iquique, hasta los 27°30'S, coincidente con el nevado Jotabeche y la laguna del Negro Francisco en la Región de Atacama. La zona de transición de ambas subespecies coincide con el límite sur de la provincia de Parinacota y se caracteriza por una drástica disminución de la densidad de individuos; hacia el sur la fragmentación es mayor (Galaz, 2005).

La fibra de vicuña, al igual que la de los otros miembros de la familia Camelidae y de la especie caprina, se encuentra incluida dentro de la clasificación de fibras animales especiales, aunque en el caso de la vicuña su producción es muy reducida con relación a la producción de lana y otras fibras. A pesar de lo anterior su fibra es buscada y bien valorada lo que justifica plenamente su producción (FAO, 2005).

La vicuña ha sido cazada para obtener su fina fibra y en Chile se convirtió en una especie en peligro de extinción, lo que motivó que en 1970 se iniciara un

efectivo programa de protección (FAO, 2005). Las acciones de protección se concentraron en la Provincia de Parinacota, donde actualmente se cuenta con tres áreas de protección (Área de Protección Caquena, Parque Nacional Lauca y Reserva Nacional Las Vicuñas). El éxito de este programa se ve reflejado en el crecimiento poblacional de la vicuña que llegó a superar los 26.000 animales a fines de la década del 90. Uno de los objetivos principales del programa de conservación era alcanzar un nivel de recuperación poblacional que permitiera el uso de la especie por parte de las comunidades locales (FAO, 2005).

Desde el inicio de la aplicación del CITES¹ (1975), que es un tratado multinacional que tiene por finalidad regular y restringir el comercio de animales y plantas consideradas en peligro o amenazadas de extinción, las poblaciones de vicuñas del país fueron incorporadas en el Apéndice I, que señalaba la prohibición absoluta de cualquier exportación con fines comerciales, ya sea de animales o de sus productos. Estas restricciones, junto a otras establecidas por algunos países, permitieron inicialmente que la especie comenzara un lento proceso de recuperación poblacional. Esta recuperación permitió en la IV reunión de las Partes CITES (Ottawa, 1987), el traslado de las poblaciones de vicuña de Perú y de la provincia de Parinacota en Chile (excepto las del Parque Nacional Lauca), al Apéndice II, con el fin de elaborar fibras y exportarlas como tela (Madariaga y Galaz, 2005). El Apéndice II especifica que existe la posibilidad de comercializar especímenes de especies incluidas en éste, cuando la autoridad administrativa del país de origen certifica que la exportación no perjudica la supervivencia de la especie y que los especímenes fueran obtenidos legalmente (Madariaga y Galaz, 2005).

En Chile, se iniciaron capturas de animales para obtención de fibra que sería transformada internamente. Las autorizaciones otorgadas por el SAG a la CONAF, tuvieron un carácter científico durante el incipiente manejo de la vicuña, ya que se enmarcaban dentro de las líneas de investigación relacionadas con

¹ CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA.

técnicas de esquila y procesamiento de fibra. Sin embargo, la experiencia nacional en el desarrollo de las telas no fue la que se esperaba. Ello motivó a Chile y a Perú a elaborar una nueva enmienda a CITES que luego de ser aprobada en la XI Reunión de las Partes (Fort Lauderdale, 1992), posibilitó la exportación de fibra a fin de transformarla en cualquier parte del mundo, con la autorización previa de la autoridad CITES correspondiente. Posteriormente, en la XII Reunión de las Partes (Santiago de Chile, 2002), las poblaciones de vicuña de la I Región fueron traspasadas del Apéndice I al II. Las poblaciones de la II y III Regiones permanecen en el Apéndice I (Madariaga y Galaz, 2005).

Actualmente, las vicuñas son capturadas y esquiladas para obtener su fibra y posteriormente son liberadas. Desde 1995, el sistema de captura y esquila se ha estudiado y usado en Chile, desarrollándose diversos módulos de crianza en semicautiverio (FAO, 2005). En Chile, la vicuña puede ser capturada únicamente con el fin de esquilarla para comercializar su fibra. La captura debe ser autorizada por el SAG y por la autoridad administrativa a cargo del área silvestre donde se encuentra la vicuña, es decir, la Corporación Nacional Forestal, si así correspondiera. La esquila y comercialización debe realizarse bajo estricto control del Estado (FAO, 2005).

3. Pestivirus

Los pestivirus son patógenos de gran importancia económica para la industria pecuaria. En Estados Unidos de Norteamérica, en los años 30, se reportó la primera enfermedad causada por un pestivirus, la peste porcina clásica (PPC) en cerdos, seguida más tarde por las enfermedades causadas por pestivirus de los rumiantes (Moenning, 1990).

Olafson *et al.*, (1946) describió una enfermedad transmisible del ganado bovino con alta morbilidad y baja mortalidad. Esta condición se caracterizaba por diarrea, fiebre y tos, por lo que fue denominada “diarrea viral bovina” (DVB). Unos

pocos años después Ramsey y Chivers (1953) reportaron una enfermedad mortal en el ganado bovino con una baja tasa de morbilidad, en donde la lesión más importante era la ulceración extensiva del tracto gastrointestinal. Luego de no poder reproducir la enfermedad experimentalmente, se pensó que ésta era una nueva condición a la que llamaron “enfermedad de las mucosas” (EM). Pocos años después se confirmó el hecho de que ambas enfermedades eran causadas por el mismo virus (Moening, 1990). Hughes *et al.*, (1959) describió una tercera enfermedad causada por un pestivirus, la “enfermedad de la frontera” (EF) del ganado ovino (Barlow y Patterson, 1982). La naturaleza infecciosa y la estrecha relación entre el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) y el VDVB fue descubierta más tarde (Acland *et al.*, 1972; Hamilton y Timoney, 1972).

La infección por el VDVB está extendida por todo el mundo, siendo endémica en la mayoría de las poblaciones de bovinos (Baker, 1995).

El VDVB es un virus ARN de hebra simple que pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. Otros dos miembros del género son el VPPC y el VEF (Wentz *et al.*, 2003). Estos agentes se encuentran relacionados estructural y antigénicamente, presentando reacciones serológicas cruzadas entre ellos (Carlsson, 1991; Sakoda *et al.*, 1999) y causando infecciones entre especies (Becher *et al.*, 1999). El éxito de la infección en los rumiantes se debe a su habilidad de cruzar la barrera placentaria, invadir el feto y generar una infección persistente que continúa durante la vida postnatal, clínicamente inaparente, excretando el virus y diseminándolo a un amplio rango de hospederos del orden *Artiodactyla* (Becher *et al.*, 1999; Paton *et al.*, 1999).

Se ha reportado que el VDVB y VEF pueden infectar un amplio número de especies unguladas domésticas y silvestres, el VPPC parece estar restringido a cerdos y jabalíes (Becher *et al.*, 2003). Los jabalíes son un reservorio del VPPC causando un problema en programas de erradicación de la peste porcina clásica (Vilceck y Nettleton, 2006).

Estudios serológicos en vida silvestre, han evidenciado la infección por pestivirus en más de 40 especies (Olde Riekerink *et al.*, 2005). Existen pocos casos confirmados de aislamiento de pestivirus desde rumiantes silvestres enfermos y no existe evidencia de que tengan impacto en animales de vida libre (Van Campen *et al.*, 2001).

El VDVB puede causar EF en ovejas y cabras, (Becher *et al.*, 1999), así como, estudios experimentales indicarían que la infección post natal de cerdos con pestivirus rumiantes no provocarían signos clínicos, pero las infecciones congénitas pueden conducir a lechones enfermos o infectados persistentemente (Paton *et al.*, 1997). El VEF puede causar una enfermedad parecida a la producida por el VDVB, en el ganado bovino (Meyers y Thiel, 1996).

En cerdos se ha encontrado VDVB y VEF (Roehe *et al.*, 1992), aunque el VPPC propio de esta especie no ha sido aislado en rumiantes (Giangaspero y Harasawa, 1999). De hecho, se ha demostrado que el VPPC puede infectar experimentalmente a ovejas, cabras y ganado bovino (Thiel *et al.*, 1996).

Además de cerdos y ovejas, el VDVB ha sido descrito en otras especies, incluyendo a la cabra, rumiantes exóticos, camélidos del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo, en donde los signos clínicos de la infección son similares a los reportados en bovinos, sin embargo, la enfermedad clínica se observa en menor grado (Wentz *et al.*, 2003).

Se han detectado anticuerpos para el VDVB en animales silvestres de la familia Cervidae: corzo (Baradel *et al.*, 1988), ciervo rojo (Mc Martin *et al.*, 1977 Lawman *et al.*, 1978), gamo (Lawman *et al.*, 1978; Karstad, 1981; Giovannini *et al.*, 1988), ciervo mula (Couvillion *et al.*, 1980), ciervo de cola blanca (Karstad, 1981) y en caribú (Elazhary *et al.*, 1981). También en búfalos (Hamblin y Hedger, 1979), jirafa (Hamblin y Hedger, 1979, Karstad, 1981), muflón de las montañas (Parks y England, 1974; Turner y Payson, 1982), antílope (Baradel *et al.*, 1988), berrendo

(Barrett y Chalmers, 1975; Doyle y Heuschele, 1983; Stauber *et al.*, 1980). Este virus también se ha detectado en animales de la familia Camelidae (Doyle y Heuschele, 1983) y muchos otros animales, principalmente de África y América. La búsqueda de anticuerpos para pestivirus y el aislamiento viral ha continuado intensivamente en los últimos 15 años (Vilcek y Nettleton, 2006).

Los pestivirus son virus pequeños y envueltos de 40 a 60 nm de diámetro, con un genoma de 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"), para una poliproteína cuyo procesamiento, mediado por proteasas virales y celulares, dará origen a las proteínas estructurales y no estructurales del virión (Becher *et al.*, 1998). En los extremos 5' y 3' del ARN existen regiones que no codifican para proteínas, llamadas "UTR" de alrededor de 360-385 bases y 228 bases, respectivamente (Vilcek *et al.*, 1999).

En la poliproteína, las proteínas virales maduras se encuentran en el siguiente orden: Npro, C, Erns, E1, E2, p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B. La primera proteína (Npro) es una proteasa no estructural seguida por la proteína de la cápside (C), que probablemente proporciona al virión una simetría icosaédrica y tres glicoproteínas de envoltura (Erns, E1, E2), siendo la glicoproteína E2 la más inmunogénica del virus, principal responsable de la generación de anticuerpos neutralizantes contra el virus y la que presenta las mayores variaciones antigénicas entre los aislados (Paton *et al.*, 1997). Las restantes proteínas, que corresponden a los dos tercios del genoma codificante, son proteínas no estructurales con diferentes actividades enzimáticas (Thiel *et al.*, 1996).

Inicialmente, los pestivirus se clasificaban en por lo menos cinco genotipos virales (Becher *et al.*, 1999; Harasawa *et al.*, 2000). Estos genotipos eran: VPPC, VDVB-I, VDVB-II, VEF y un genotipo representado por un único aislado viral, llamado Jirafa-I (Bolin y Grooms, 2004). Actualmente, mediante el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de los pestivirus, se reconocen

nuevos genotipos virales que se adicionan a los anteriores: VEF-I (originalmente VEF), VEF-2, VEF-3, VEF-4 y el genotipo pronghorn, aislado de un antílope (Vilceck y Nettleton, 2006).

En el genotipo VDVB-I, se ubican la mayoría de los aislados de baja virulencia y las cepas de laboratorio, y en el genotipo VDVB-II se ubican cepas de baja virulencia y todos los aislados de reciente aparición de alta virulencia, especialmente los responsables del “síndrome hemorrágico”. Este síndrome se presenta en animales de todas las edades, con cuadros de fiebre, diarrea, leucopenia y trombocitopenia que conduce a manifestaciones hemorrágicas que llevan a la muerte del animal (Pellerin *et al.*, 1994).

Las cepas de VDVB-I están distribuidas mundialmente, mientras que las cepas de VDVB-II se han identificado principalmente en Estados Unidos de Norteamérica y Canadá, con unos pocos reportes de su presencia en Europa, Japón y Sudamérica (Vilceck *et al.*, 2003). En aislados pestivirales de animales de vida silvestre se ha identificado principalmente el genotipo I (Vilceck y Nettleton, 2006).

Los pestivirus de los rumiantes y en particular el VDVB, constan de dos biotipos: citopático (CP) y no citopático (NCP), según los efectos que ejercen sobre cultivos de células. El biotipo CP induce vacuolización y muerte celular y el biotipo NCP establece una infección persistente inaparente en los cultivos celulares. Este último es el más frecuente en la naturaleza y es capaz de atravesar la placenta e invadir al feto, provocando en él, en condiciones adecuadas, una infección persistente que es crucial para la mantención y diseminación del virus. Los virus NCP desencadenan una amplia gama de trastornos congénitos, intestinales y de la reproducción. Por el contrario, los virus CP suelen causar la enfermedad de las mucosas en los animales que presentan una infección persistente previa por el biotipo NCP (Grooms, 2004).

Los virus ARN son altamente mutables en comparación con los virus ADN. Los virus ARN con un genoma de hebra simple de polaridad positiva, como el VDVB, están sujetos a modificaciones genómicas, que incluyen a mutaciones puntuales y recombinación del ARN (Bolin y Grooms, 2004).

La habilidad para generar mutaciones constantemente, permite a los virus ARN adaptarse rápidamente a la respuesta del hospedero y, en algunos casos, establecer infecciones crónicas o persistentes mediante la utilización de variados mecanismos (Domingo *et al.*, 1998). Esta habilidad permite prolongar la diseminación del virus y favorecer su sobrevivencia en la naturaleza (Bolin y Grooms, 2004).

Los mutantes virales de baja virulencia, al parecer, se adaptarían mejor al hospedero y permanecerían más fácilmente en la naturaleza. Estos virus provocarían pocos efectos adversos en el hospedero permitiendo así su sobrevivencia y podrían tener un período mas prolongado de diseminación. La mayoría de los aislados virales del VDVB son de baja virulencia y del biotipo NCP (Bolin y Grooms, 2004).

La recombinación viral permite al virus cambiar segmentos de su genoma y crear nuevas especies virales. En el VDVB no se ha demostrado que se creen nuevas especies virales (un nuevo genotipo viral), pero sí ocurren cambios en el biotipo viral (Vilcek *et al.*, 2000). El biotipo NCP es el que sufre la recombinación, generalmente, en la proteína no estructural NS2-3 dando origen al biotipo CP. Esta proteína se separa en dos proteínas más pequeñas NS2 y NS3. La proteína NS3 es considerada un marcador molecular de los virus CP y la causa del efecto citopático (Donis y Dubovi, 1987). También existe la reversión del VDVB CP a VDVB NCP, el biotipo resultante generalmente pierde la habilidad de expresar la proteína NS3, sin embargo, se han identificado algunos VDVB NCP que retienen la expresión de NS3 sin causar efecto en cultivos celulares (Qu *et al.*, 2001; Harding *et al.*, 2002).

4. Patogenia del virus Diarrea Viral Bovina

La transmisión del virus, en bovinos puede ser horizontal o vertical, por contacto directo o indirecto. La principal fuente de infección y reservorio del virus en la naturaleza son los bovinos persistentemente infectados (PI). Ellos eliminan continuamente y durante toda su vida, grandes cantidades de virus en secreción nasal, saliva, orina, materia fecal, lágrimas, semen y leche. Los animales con infección aguda también son fuente de infección, aunque menos eficientes ya que eliminan el virus en cantidades más bajas y por cortos periodos (Houe, 1995).

El ganado que sufre una primoinfección por pestivirus sufre una viremia que dura entre 4-8 días (Radostits y Littlejohns, 1988; Houe, 1995). Las infecciones agudas del ganado bovino ocurren principalmente en animales jóvenes y pueden ser clínicamente inaparentes, o producir una enfermedad clínica leve o grave en animales de todas las edades. Los animales afectados quedan predispuestos a infecciones recurrentes, debido al efecto inmunosupresivo del virus (Chase *et al.*, 2004).

El VDVB es responsable de originar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones como resultado de la interacción de factores tales como: cepa y biotipo viral, edad y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes (Bielefeldt, 1995). El VDVB afecta muchos sistemas y en bovinos puede causar enfermedad clínica severa. Los sistemas comúnmente afectados son el respiratorio, gastrointestinal y reproductivo (Baker, 1995).

Se ha demostrado que el virus tiene efecto sinérgico con el virus herpes bovino tipo 1 y el virus sincisial respiratorio bovino. Las infecciones con el VDVB también se han asociado con cuadros producidos por infecciones con salmonellas, *Escherichia coli*, rotavirus, coronavirus y con estomatitis bovina, producidas por otros agentes virales (Qu *et al.*, 2001; Harding *et al.*, 2002).

El rol del VDVB en el complejo respiratorio bovino ha sido estudiado recientemente (Grooms, 2004). Estudios experimentales sugieren que algunos aislados del VDVB poseen un mayor tropismo por el sistema respiratorio y se pueden asociar mayormente con las enfermedades respiratorias del bovino en comparación con otros aislados (Hamers, *et al.*, 2000; Baule *et al.*, 2001).

Si un virus no citopatogénico infecta al feto, puede resultar en pérdida embrionaria, aborto, nacimiento prematuro, efectos teratogénicos o una infección congénita que persiste en el ternero recién nacido (OIE, 2000).

Cuando la infección del feto ocurre antes de los 125 días de gestación y previo a la inmunocompetencia, si no se produce aborto, el ternero nacerá con una viremia persistente. No existen lesiones patognomónicas (Baker, 1995). Los signos clínicos varían desde animales aparentemente sanos hasta animales débiles, susceptibles a otras enfermedades como neumonía y que presentan dificultad para mantenerse de pie y mamar. Más tarde estos terneros pueden presentar defectos del sistema nervioso central, como temores musculares, incoordinación y ceguera, muriendo a los pocos días de nacidos (Carman *et al.*, 2005). Los animales que sobreviven y se presentan PI son una fuente continua de infección para los animales susceptibles (OIE, 2000).

Los animales persistentemente infectados con una cepa NCP del virus, son los que pueden desarrollar el cuadro de enfermedad de las mucosas cuando se reinfectan con una cepa del biotipo CP (Grooms, 2004).

La enfermedad de las mucosas 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 que a la necropsia se extiende a lo largo de todo el tubo digestivo (Baker, 1995).

Las infecciones fetales que ocurren entre los días 100 y 150 de gestación desarrollaran en el feto una serie de defectos congénitos del sistema nervioso central como hipoplasia cerebelar, microencefalia, hidrocefalia, porencefalia, hidranencefalia, hipomielinización, o con defectos del sistema ocular: cataratas, microftalmia, degeneración retinal y neuritis óptica (Grooms, 2004).

Si la infección se produce luego de los 125 de días de gestación, el sistema inmune del feto ya estará desarrollado y la infección generalmente desencadenará una respuesta inmune con el nacimiento de terneros normales y con anticuerpos para el VDVB. Aunque a este período también se le atribuyen abortos y nacimientos de terneros débiles al VDVB.

Algunas cepas de VDVB de mayor virulencia son responsables de provocar el síndrome hemorrágico. Se presenta en animales de todas las edades, con cuadros de fiebre, diarrea, leucopenia y trombocitopenia que conduce a manifestaciones hemorrágicas que llevan a la muerte del animal (Pellerin *et al.*, 1994).

5. Respuesta Inmune

La infección con el VDVB en el ganado susceptible provoca la producción de anticuerpos específicos para el virus (Fredriksen *et al.*, 1999), que se producen dentro de 2-3 semanas post infección. Los títulos de anticuerpos pueden continuar subiendo por semanas y permanecer hasta por toda la vida de un animal recuperado (Edwards, 1990). La inmunidad puede adquirirse activamente mediante una infección o pasivamente mediante la transferencia de anticuerpos calostrales (Sandvick, 1999).

La respuesta inmune contra agentes infecciosos es de dos tipos: celular y humoral. Se ha demostrado en vacas seropositivas al VDVB la presencia de inmunidad celular, mediante la proliferación de células sanguíneas mononucleares

luego de la exposición in vitro al VDVB, no así en terneros, quienes se supone, se inmunizan pasivamente mediante anticuerpos calostrales, ya que estos declinan su título durante los primeros meses de vida (Larsson y Fossum, 1992),

La infección generalmente es subclínica y los anticuerpos neutralizantes pueden detectarse en el suero dentro de la primera y la tercera semana de infección (Gutekunst y Malmquist, 1964; Nuttall *et al.*, 1980; Bolin *et al.*, 1985) y por años después de una infección aguda en animales inmunocompetentes. Esto indica que la detección de un animal serológicamente positivo es un buen indicador de infección por el virus (Howard, 1990). Se ha reportado que los anticuerpos aumentan por 10 a 12 semanas, luego se mantienen y declinan lentamente. En algunos animales se ha reportado que los títulos de anticuerpos declinan luego de unos pocos meses y luego se incrementan (Brownlie *et al.*, 1987). Se sugiere que esta alza se debe a una reinfección (Fredriksen *et al.*, 1999). Sin embargo, se considera que la producción de anticuerpos y su consecuente protección contra reinfecciones por cepas homólogas del virus son para toda la vida (Duffell y Harkness, 1985). Esto indica que la detección de la infección viral se hace más exitosa cuando se buscan anticuerpos en el suero de los animales, por su mayor permanencia en el tiempo, que cuando se busca el virus propiamente tal. Sin embargo, cabe tener presente que los animales persistentemente infectados serán encontrados en el grupo de animales seronegativos, aunque es conocido que un pequeño porcentaje de animales persistentemente infectados pueden tener anticuerpos neutralizantes, como respuesta a infecciones naturales con cepas de pestivirus heterólogas a la que produjo la condición de inmunotolerancia (Chase *et al.*, 2004).

La presencia de anticuerpos para el VDVB es un indicador de que existió una respuesta inmune más que un indicador de una respuesta inmune protectora. Niveles altos de anticuerpos neutralizantes previenen el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, se ha visto que algunos animales que presentan anticuerpos neutralizantes presentan viremia (Fredriksen *et al.*, 1999). La

presencia de anticuerpos neutralizantes aparece antes y en niveles más altos en animales infectados con la cepa NCP que con la cepa CP (Chase *et al.*, 2004).

6. Diagnóstico

Para identificar animales cursando una infección con el VDVB, las pruebas diagnósticas más utilizadas son la detección de antígenos virales en tejidos o en células (aislamiento viral), las pruebas serológicas (inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa o ELISA) y la detección del genoma viral por la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR). Indirectamente, el diagnóstico también se puede hacer por la detección de anticuerpos para pestivirus en circulación sanguínea mediante las pruebas de seroneutralización (SN) y de ELISA (Edwards, 1990).

La SN es una prueba sensible y específica para la detección de anticuerpos contra el VDVB y ha sido reconocida por años como la prueba serológica de referencia (Edwards, 1990). Esta prueba consiste en detectar la presencia de anticuerpos en un suero problema mediante la neutralización del efecto citopático del VDVB. Esta prueba no distingue entre la respuesta de anticuerpos a infecciones naturales y la respuesta a vacunaciones (OIE, 2000).

Los anticuerpos neutralizantes de la infectividad del virus, presentan reacciones cruzadas con otras cepas del VDVB por lo tanto los títulos de anticuerpos de un suero obtenido de un animal infectado dependerán de la cepa viral usada (Brock, 1995). En contraste, los anticuerpos para NS2-3, proteína antigénicamente conservada entre los pestivirus y esencial para la replicación intracelular, no neutralizan al VDVB, pero desde que se detectaron, son importantes para estudios antigénicos del virus (Sandvick, 1999).

7. Virus Diarrea Viral Bovina en camélidos

Existen pocos estudios de seroprevalencia y de la enfermedad clínica de DVB en camélidos del Nuevo Mundo. Los anticuerpos para el virus en camélidos del Nuevo y Viejo Mundo fueron identificados por primera vez en 1983 (Doyle y Heuschele, 1983).

Considerando la prevalencia de éste virus en el ganado bovino y basado en los datos de seroprevalencia y detecciones del virus, se cree que los camélidos del Nuevo Mundo no se infectan fácilmente. Las alpacas y llamas son relativamente resistentes a la infección con el VDVB o el virus se disemina en bajas concentraciones, lo que hace ineficiente la transmisión del agente a animales susceptibles (Mattson *et al.*, 2006). Sin embargo, existen informes de aislamiento del virus desde llamas con excesiva descarga nasal (Mattson, 1994) y desde llamas con diarrea (Evermann *et al.*, 1993; Mattson, 1994).

El pestivirus que se ha aislado predominantemente desde llamas y alpacas ha sido el VDVB (Yousif *et al.*, 2004). Esto ha permitido llegar a la conclusión que el virus se ha diseminado desde el ganado bovino a los camélidos (Wentz *et al.*, 2003). Recientemente, el aislamiento del virus desde un camello enfermo e infectado, permitió saber que éste animal no es solamente susceptible a la infección, si no que también es capaz de presentar la enfermedad (Yousif *et al.*, 2004).

Motha y Tham (1992), reportaron por primera vez la detección de anticuerpos para el VDVB en el suero de una llama que mantuvo contacto durante 12 meses con una vaca y su ternero, quienes se encontraban virémicos. Hasta esa fecha, existía solamente un reporte de infección con el VDVB en dos guanacos, luego de un episodio de abortos en 10 cabras domésticas en el zoológico de Memphis en Estados Unidos de Norteamérica (Doyle y Heuschele, 1983).

En un estudio serológico realizado en Perú, de 117 alpacas clínicamente sanas, que mantenían contacto limitado durante los meses de invierno con ovinos y bovinos, el 11,1% presentó anticuerpos para el VDVB (Rivera *et al.*, 1987). Álvarez *et al.* (2002), confirmaron la presencia de la infección pestiviral en alpacas, bovinos y ovinos bajo un sistema de crianza mixto en una comunidad campesina del Cuzco.

En otro estudio de seroprevalencia en Oregon, Estados Unidos de Norteamérica, de 271 llamas procedentes de 21 rebaños, se evidenció la presencia de anticuerpos en un 4,4% de los animales. De los 12 animales en donde se detectó anticuerpos para el VDVB, 7 mantenían contacto con el ganado bovino (Picton, 1993).

La seroprevalencia para VDVB en un estudio de 390 llamas en Argentina, fue de 2,05%. En este estudio, las pasturas en donde se ubicaban los animales eran compartidas con ovejas y bovinos (Puntel *et al.*, 1999). Sin embargo, Karesh *et al.* (1998), no detectaron anticuerpos para el virus en guanacos de vida libre de este mismo país.

En estudios más recientes, Wentz *et al.* (2003), a través de la infección experimental de llamas y alpacas con VDVB, detectó presencia de anticuerpos específicos para el virus y viremia, pero no se observaron signos de enfermedad. La inoculación de llamas durante la gestación no generó infección fetal o infección persistente en la crías. La seroprevalencia del VDVB fue de un 0,9% en llamas y alpacas. Por otra parte, Mattson *et al.* (2006), reportó el aislamiento del virus, desde crías persistentemente infectadas.

8. Infección por pestivirus en Chile

En Chile, 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), 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).

Por otra parte, existe evidencia serológica que confirma la infección por pestivirus en ovinos y caprinos. En un estudio realizado en 22 ovejerías del sur del país, utilizando una prueba de ELISA con anticuerpos monoclonales, se detectaron animales seropositivos a la enfermedad de la frontera, con una seroprevalencia promedio de los rebaños individuales de un 8,5 %, con un rango de 0% a un 42,8% (Tadich *et al.*, 1998). Además, en un estudio realizado en rebaños de la Región Metropolitana, Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo y Región de Magallanes y Antártica Chilena, se detectó la presencia de anticuerpos seroneutralizantes para pestivirus (Sandoval, 2000).

En otro estudio, realizado en ovejas y cabras procedentes de distintas regiones del país, se detectó la presencia de anticuerpos para la cepa NADL del VDVB en un 18,7% de los ovinos y un 19,3% de los caprinos. En este mismo estudio, se detectó seropositividad para VDVB en un 11% de las alpacas y un 14 % de las llamas analizadas, las que provenían de rebaños de la Región Metropolitana (Celedón *et al.*, 2001).

Por otra parte, sueros de guanacos provenientes de la Región de Magallanes y de la Antártica Chilena y sueros de vicuñas de la Región de Tarapacá, no presentaron anticuerpos contra el VDVB (Celedón *et al.*, 2001).

También se ha detectado la presencia de alpacas persistentemente infectadas e inmunotolerantes al VDVB, en un rebaño que sufrió un brote de abortos en la zona central (Arce, 2001).

Estudios recientes, realizados en la Región Metropolitana, han permitido confirmar la infección de alpacas y llamas por el VDVB. En estos estudios se pudo aislar el VDVB desde 10 alpacas y 8 llamas de un total de 42 alpacas y 35 llamas vivas, 2 llamas muertas y un feto abortado (Celedón *et al.*, 2006).

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Conocer si las vicuñas del altiplano chileno se han infectado con un virus que comparte antígenos con el virus de la diarrea viral bovina.

2. Objetivo Específico

Conocer si en sueros de vicuñas del altiplano chileno de distinto sexo existen anticuerpos que neutralicen la infecciosidad del virus diarrea viral bovina.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Muestras

Suponiendo que el porcentaje de animales serológicamente positivos en la población es de un 3,5%, se trabajó con un nivel de confianza del 95%, para detectar individuos positivos en un tamaño muestral de 90 sueros de vicuñas (Thursfield, 1986). Esto sueros se obtuvieron de vicuñas en semi-cautiverio en las localidades de Caquena y Chislluma, comuna de Putre y General Lagos, respectivamente, provincia de Parinacota, Región de Tarapacá, durante el año 2005 (Cuadro N° 1).

Las muestras se conservaron congeladas en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

CUADRO N° 1

Localidad, sexo de los animales y número de animales de los cuales se obtuvieron las muestras utilizadas para detectar la presencia de anticuerpos para el VDVB.

	Localidad		Total
Sexo	Chislluma	Caquena	
Macho	13	22	35
Hembra	30	25	55
Total	43	47	90

2. Virus

Para realizar el estudio se utilizó la cepa de referencia NADL (ATCC VR-1422), obtenida del National Animal Disease Laboratory, cuya fuente de origen fue desde un bazo extraído de un bovino muerto por VDVB en un rebaño cerrado.

3. Obtención de células de pulmón fetal bovino

Para realizar las pruebas de seroneutralización se emplearon cultivos primarios de células de pulmón fetal bovino. Para ello, se extrajeron pulmones de fetos bovinos de menos de 3 meses de gestación de plantas faenadoras de carnes de la Región Metropolitana.²

Los pulmones se procesaron lo más asépticamente posible el mismo día del sacrificio. Para esto se trasladaron los fetos al laboratorio, se extrajeron los pulmones y se lavaron con Salina A de Puck (Lennette y Schmidt, 1964). Posteriormente, los pulmones se fragmentaron con tijeras y los trozos se lavaron 3 a 4 veces con salina A de Puck. Una vez eliminada la salina del último lavado, se adicionó 30 ml de tripsina 0,25% disuelta en salina A de Puck, a 37°C y se incubó por 30 minutos con agitación. Pasado este tiempo, se eliminaron los trozos de tejidos y el sobrenadante con las células desprendidas se centrifugó a 2000xg por 5 minutos. Las células se resuspendieron en salina A de Puck y luego se volvieron a centrifugar (Lennette y Schmidt, 1964). Sobre el tejido no disociado en células se repitió el proceso de tripsinización por tres a cuatro veces, recuperando y lavando las células del mismo modo antes descrito. Las células se suspendieron en medio de cultivo (MEM), adicionado de un 10% de suero equino, 100 U.I. de penicilina y 100 µg de estreptomycinina por mL, ajustando a una concentración de 1 millón de células por mL. Las células se sembraron en botellas de cultivo, se incubaron a

² PLANTAS FAENADORAS DE CARNES: MATADERO LA PINTANA Y AGRICOLA INDUSTRIAL LO VALLEDOR AASA S.A.

37° C y a las 24 horas de sembradas se cambió el MEM por uno fresco de iguales características que el anterior. Luego de tres a cuatro días de incubación a 37° C, una vez formada la monocapa celular, se procedió a congelar las células a modo de conservarlas para su uso posterior.

4. Congelación de células de pulmón fetal bovino

Las monocapas celulares desprovistas de medio de cultivo se lavaron en Salina A de Puck a 37°C y se disgregaron mediante la aplicación de tripsina verseno (tripsina 0,05 %, verseno 0,02 % en salina A de Puck), calentada a 37° C. Una vez disgregadas las células, se suspendieron en 10 mL de salina A de Puck y se recuperaron por centrifugación a 2000xg por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se adicionó medio de cultivo ajustando a una concentración de 1 – 2 millones de células por mL y se agregó suero equino en un 10% de concentración. Luego, la suspensión celular se distribuyó en alícuotas de 1,5 mL y se adicionó, lentamente, un 10% de DMSO como criopreservante. En cada alícuota se registró el tipo de célula con un código de referencia, número de pasaje y fecha de la congelación. El proceso de congelación se realizó en forma gradual disminuyendo la temperatura a 4°C, luego a -20°C, luego a -70 °C y finalmente se introdujeron lentamente en un termo con nitrógeno líquido a -196° C.

5. Descongelación de células de pulmón fetal bovino

Para descongelar células conservadas en nitrógeno líquido, una alícuota se descongeló sometiéndola a una temperatura de 37° C en un baño termostático, luego se dispusieron en una botella con 9 mL de MEM y 1mL de suero equino, se incubaron a 37°C por 24 horas y se cambió el medio por uno fresco con 10% de suero equino y se volvieron a incubar a 37°C, hasta que se formó una monocapa de células, lo que se produjo al cuarto a quinto día después de haberse puesto a cultivar. Una vez formada la monocapa se extrajo el sobrenadante, se lavó la

monocapa con salina A de Puck, se adicionó tripsina verseno (tripsina 0,05 %, verseno 0,02 % en salina a de Puck) a 37°C y una vez disgregadas las células se ajustaron a una concentración de 80.000 células por mL de medio de cultivo y se dispusieron en botellas de cultivos celulares de 10 mL, constituyendo éste el segundo pasaje celular. Se realizaron como mínimo 7 pasajes celulares, para comprobar la ausencia de contaminación de los cultivos con VDVB mediante la prueba de inmunofluorescencia directa.

6. Prueba de Inmunofluorescencia Directa

Para realizar la prueba de inmunofluorescencia directa (Lennette y Schmidt, 1964), 400.000 células del séptimo pasaje se sembraron en laminillas de vidrio dentro de tubos Leighton. Al tercer día de sembradas y mantenidas a 37° C, se retiraron las laminillas de vidrio con las monocapas celulares y se cubrieron con tampón PBS pH 7,6 0,01M por 5 minutos para lavar las células. En seguida, las laminillas se sumergieron en acetona enfriada a -20° C por 10 minutos, para fijar las células al vidrio y se dejaron secar por 3 horas bajo una lámpara encendida. Posteriormente, las laminillas se conservaron a -20° C hasta el momento de aplicar el conjugado fluorescente.

El conjugado fluorescente previamente titulado, se preparó en la dilución óptima de trabajo con PBS 0.01M, pH 7.6, agregando azul de Evans como tinción de contraste (Lennette y Schmidt, 1964).

Previo a la aplicación del conjugado fluorescente, las laminillas se hidrataron por 5 minutos en PBS 0.01 M, pH 7.6. Luego se incubaron a 37° C por 15 minutos, se agregó sobre ellas 30 µL del conjugado fluorescente y se incubaron en una cámara húmeda a 37°C por 30 minutos. Terminado este procedimiento, las laminillas se lavaron por 5 minutos, cada vez, tres veces con PBS 0.01 M, pH 7.6 y una vez con agua bidestilada desionizada. Las laminillas se

montaron sobre un portaobjetos con glicerina diluida al 50% en PBS 0.01M, pH 7.6 (Lennette y Schmidt, 1964) y se observaron en un microscopio para fluorescencia marca Nikon, modelo Optiphot-2, serie 13767, con aumentos 200X y 400X junto a controles positivos y negativos.

7. Titulación Viral

Como antígeno en la prueba de seroneutralización se empleó la cepa citopatógena NADL del VDVB previamente titulada, para lo cual, en una microplaca de 96 pocillos se realizaron diluciones en base 10 de la suspensión viral, desde 1/10 hasta 1/1.000.000, en MEM. Posteriormente, se inocularon 25 μ L de cada dilución del virus en dos pocillos de una microplaca de fondo plano, a los que posteriormente se les agregó 25 μ L de una suspensión de células de pulmón fetal bovino, libre del VDVB, en concentración de 160.000 células/mL en MEM adicionado con 16% de suero equino. Finalmente, la microplaca se incubó a 37°C por 3-5 días en una cámara con 5% de CO₂.

El título viral correspondió a la dilución del virus que produjo efecto citopático en el 50% de los cultivos celulares inoculados y se expresó en dosis infectantes de cultivo de tejido 50% (DICT50). El cálculo se realizó por el método de Reed y Muench (Lennette y Schmidt, 1964).

8. Seroneutralización

Las muestras de suero mantenidas congeladas a -20° C se descongelaron y se inactivaron a 56° C por 30 minutos en un baño termostático. En una microplaca de fondo plano de 96 pocillos se realizaron diluciones de cada uno de los sueros con MEM, en base 2, desde 1/2 hasta 1/128, incluyendo un suero desprovisto de anticuerpos (control negativo de la prueba) y un suero con

anticuerpos para el VDB (control positivo de la prueba), Cada dilución de suero se hizo reaccionar con 100 DICT50 de la cepa citopagénica NADL del VDVB. La mezcla suero-virus se incubó a 37°C por 60 minutos y luego a cada pocillo se adicionó 50 μ L de una suspensión de células de pulmón fetal bovino libres de VDVB, adicionado de un 16% de suero equino, en una concentración de 80.000 células/mL. Finalmente, la microplaca se incubó a 37°C, con 5% de CO₂, revisándola diariamente por un período de 3-5 días, para observar la presencia de efecto citopático en las células.

Paralelamente, se realizaron controles de: viabilidad celular, cultivando las células en ausencia del suero en estudio y de virus; citotoxicidad de los sueros, cultivando las células en presencia de cada suero problema, pero en ausencia del virus; de título del virus y de las DICT50 empleadas en el ensayo, para ello se hicieron diluciones en base 10 del virus sin diluir y de la suspensión viral que contiene las DICT50 usadas en la prueba de seroneutralización, mediante diluciones en base 10 de cada suspensión celular respectiva.

El título del suero se expresó como el valor recíproco de la dilución del suero que protegió al 50% de los pocillos con las células expuestas y se calculó por el método de Reed y Muench (Lennette y Schmidt, 1964).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 90 muestras de sueros de vicuña analizados, en ninguna se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes para la cepa de referencia NADL del VDVB o para algún otro virus antigénicamente relacionado. Este resultado permite asumir que las vicuñas no se han infectado con un VDVB que comparta antígenos con la cepa NADL del VDVB y, en caso de existir la infección dentro de la población de vicuñas estudiada, ésta se encontraría en un porcentaje menor al 3,5%.

El no haber encontrado animales serorreaccionantes para el VDVB en el grupo de vicuñas estudiadas, puede deberse a que esta especie no es susceptible de infectarse con pestivirus, ya que se describe que los CSA son bastante resistentes a infecciones pestivirales. Esto basado en su baja prevalencia serológica, los escasos problemas descritos para los rebaños de camélidos y al hecho de que en los limitados estudios de inoculación experimental que existen, no se ha observado patogenicidad (Mattson, 1994; Wentz *et al.*; 2003).

Otra razón que puede explicar la ausencia de vicuñas serorreaccionantes para el VDVB, es que el virus no está presente en esta población, por tratarse de animales aislados geográficamente, sobre los 4.000 m.s.n.m., lo que dificulta el contacto con otras especies de rumiantes que podrían transmitir el VDVB, principalmente el ganado bovino. Al respecto, se describe que la principal fuente de infección por pestivirus para otros camélidos como llamas y alpacas, son los bovinos (Wentz *et al.*, 2003; Mattson *et al.*, 2006; Evermann, 2006). Esto se confirma en llamas y alpacas de la Región Metropolitana, que podrían haber estado en contacto con ganado bovino, ya que han resultado ser seropositivas para el VDVB (Celedón *et al.*, 2001) y también se ha aislado el virus desde animales con y sin sintomatología clínica (Celedón *et al.*, 2006).

El no haber detectado anticuerpos seroneutralizantes para el VDVB también puede deberse a que existe una gran variabilidad antigénica entre y dentro de las diferentes especies virales de pestivirus (Edwards, 1990), y pudo, en este caso, suceder que la cepa NADL utilizada en la prueba de neutralización, no haya compartido antígenos neutralizables con la cepa viral presente en la población de vicuñas. Las cepas más comúnmente utilizadas en estudios serológicos son las que han sido aisladas desde bovinos y, pueden no reflejar totalmente a los pestivirus que están circulando dentro de los miembros de la familia Camelidae (Mattson, 1994). No ha sido reportado un pestivirus único para el grupo de los camélidos, como es el caso de los animales silvestres (Frolich y Hoffmann, 1995); de la jirafa (Bolin y Grooms, 2004) y el antílope (Vilceck y Nettleton, 2006). Sin embargo, existe la posibilidad de que aún no hayan sido identificados pestivirus únicos para estas especies (Evermann, 2006).

También pudo haber contribuido a no detectar vicuñas serorreaccionantes al VDVB, la acción de la radiación ultravioleta en el altiplano chileno, que disminuiría la infectividad de las partículas virales presentes como contaminantes en pastos, bebederos y otros aperos de uso corriente en estos animales (Roehle y Edwards 1992; Thiel *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2002).

Estudios anteriores sobre infecciones virales en vicuñas realizados en Chile, indican la ausencia de anticuerpos seroneutralizantes para el VDVB y para el virus herpes bovino tipo 1 en 34 vicuñas (Celedón *et al* 2001); la detección de 14 animales con anticuerpos seroneutralizantes para el virus herpes equino 1 en 25 animales (Vergara 2004) y la detección de 25 animales con anticuerpos neutralizantes para el virus parainfluenza 3 en 92 animales (Aguirre *et al.*, 2006). Este último trabajo se realizó con las mismas muestras que se utilizaron en el presente estudio, lo que descarta la posibilidad de que se haya afectado la viabilidad de los anticuerpos al ser transportados desde la Primera Región del país hasta la Región Metropolitana o que hayan existido errores en su recolección.

Es importante destacar el hecho de que los resultados de este estudio concuerdan con los obtenidos anteriormente por Celedón *et al.*, (2001), en donde no se detectaron anticuerpos para el VDVB en un grupo de vicuñas de la Región de Tarapacá.

La posibilidad de que existan individuos serorreaccionantes en un porcentaje inferior al 3,5% no debe descartarse, ya que estudios realizados anteriormente en CSA domésticos dan cuenta de una seroprevalencia de un 0,9% al VDVB en 223 llamas y alpacas (Wentz *et al.*, 2003) y de un 2,05% en un estudio realizado en 390 llamas en Argentina (Puntel *et al.*, 1999).

Es posible pensar que la no detección de anticuerpos en sueros de vicuñas se deba a que esta especie sea poseedora de un pestivirus propio, que no comparte antígenos con los pestivirus comunes.

Este estudio contribuye al conocimiento de las enfermedades virales que afectan a los CSA presentes en la Región de Tarapacá, ya que el VDVB infecta tanto a bovinos, con una alta prevalencia tanto en el ganado de carne como de leche, como a ovinos, especie esta última utilizada para el autoconsumo y que se mantiene en contacto con CSA en zonas altiplánicas.

Es importante considerar que en los territorios de la puna, particularmente aquellos ubicados en la provincia de Parinacota (Región de Tarapacá), el incremento de la población de vicuñas ha generado una competencia por el aprovechamiento forrajero con rebaños de llamas, alpacas y ovinos de las comunidades indígenas; concentrándose en los bofedales las principales zonas en pugna por el acceso al talaje entre camélidos silvestres y domésticos (Galaz, 2005). Esto posibilita la transmisión entre especies del VDVB.

Hay que considerar también la ubicación limítrofe de las localidades en donde se realizó el estudio, lo que posibilita el contacto con CSA y ovinos de

Bolivia y Perú que podrían estar infectados con el virus. De hecho, en Perú existe evidencia de la presencia del virus en sistemas de crianza mixta, tal como lo indican los estudios realizados por Rivera *et al.* (1987) y Álvarez *et al.* (2002).

Por lo tanto, debido a la ausencia del VDVB en las vicuñas nacionales, o por lo menos en niveles importantes, se recomienda mantener o reforzar las barreras sanitarias para impedir la introducción del VDVB. Algunas de estas medidas incluyen evitar el contacto de vicuñas con otros rumiantes que posiblemente estén infectados con el virus, además de vigilar la introducción de animales infectados con el virus al altiplano chileno. Para contribuir con esto sería importante realizar estudios serológicos de detección del VDVB en ovinos que habitan en el altiplano, así como en llamas, alpacas y guanacos, para conocer el estado sanitario de estas especies y tomar medidas de bioseguridad en los predios en donde estas sean manejadas productivamente.

CONCLUSIÓN

Se concluye que menos del 3,5% de las vicuñas de la Región de Tarapacá, Provincia de Parinacota, ubicadas en la localidades de Caquena y Chislluma, podrían estar infectadas por un virus que comparte antígenos comunes con la cepa NADL del VDVB.

BIBLIOGRAFÍA

ACLAND, H.M.; GARD, G.P.; PLANT, J.W. 1972. Infection of sheep with a mucosal disease virus. Aust. Vet. J. 48: 70.

AGUIRRE, I.M.; SANTIBAÑEZ, M.C.; CELEDÓN, M.O. 2006. Detection of neutralizing antibodies against Bovine Parainfluenza virus-3 (BPIV-3) in vicuñas in Chile. ESVV. 7th International Congress of Veterinary Virology – September 2006, Lisboa, Portugal.

ÁLVAREZ, S.; RIVERA, H.; PEZO, C.; GARCIA, W. 2002. Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Canchis, Cusco. Rev. Inv. Vet. Perú 13: 46-51.

ARCE, C. 2001. Infección por pestivirus en un rebaño de alpacas de la Zona Central de Chile. Memoria de Título. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias. Santiago, Chile. 42 pp.

BAKER, J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11: 425-445.

BARADEL, J.M.; BARRAT, J. BLANCOU, J.; BOUTIN, J.M.; CHASTEL, C.; DANNACHER, G., DELORME, D.; GERARD, Y.; GOURREAU, J.M.; KIHM, U.; LARENAUDIE, B.; LE GOFF, C.; PASTORET, P.; PERREAU, P.; SCHWERS, A.; THIRY, E.; TRAP, D.; UILENBERG, G.; VANNIER, P. 1988. Results of a serological survey of wild mammals in France. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 7: 873-883.

BARRET, M.W.; CHALMERS, G.A. 1975. A serological survey of pronghorns in Alberta and Saskatchewan. 1970. J. Wildl. Dis. 11: 157-163.

BARLOW, R.M.; PATTERSON, D.S.P. 1982. Border disease of sheep: a virus-induced teratogenic disorder. In: Berchtold, N., Mayr, A., Sporri, H., White, E.G. (Eds.). *Advances in Veterinary Medicine*. Parey Scientific Publisher. Berlin, Germany. Pp. 123-137.

BAULE, C.; KULCSAR, G.; BELAK, K. 2001. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type I. *J. Clin. Microbiol.* 39: 146-153.

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

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

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

BIELEFELDT, O. 1995. The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. Clin. North.Am. Food Anim. Pract.* 11: 447-476.

BOLIN, S.R.; MC CLURKIN, A.W.; CORIA, M.F. 1985. Effects of bovine viral diarrhoea virus on the percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 46: 884-886.

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

BROCK, K.V. 1995. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 11: 549-561.

BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J.; POCOCK, D.H. 1987. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *A. Rech. Vét.* 18: 157-166.

CARMAN, S.; CARR, N.; DELAY, J. 2005. Bovine viral diarrhoea virus in alpaca: abortion and persistent infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 589- 593.

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

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

CELEDÓN, M.; VARGAS, C.; SALINAS, A.; CASANOVA, A.; L. IBARRA, BERRÍOS, P. 1996. Prevalencias serológicas para el virus de la diarrea viral bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. *Av. Cs. Vet.* 12: 98-100.

CELEDÓN, M.; SANDOVAL, A.; DROGUETT, J.; CALCIO, 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.

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

COUVILLION, C.E.; JENNEY, E.W.; PEARSON, J.E.; COKER, M.E. 1980. Survey for antibodies to viruses of bovine viral diarrhoea virus, bluetongue and epizootic haemorrhagic disease in hunter-killed mule deer in New Mexico. J. Am. Vet. Med. Assoc. 177: 790-791.

DOMINGO, E.; BARANOWSKI, E.; RUIZ-JARABO, C.M.; MARTIN-HERNANDEZ, A.M.; SAIZ, J.C.; ESCARMIS, C. 1998. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. Emerg. Infect. Dis. 4: 521-527.

DONIS, R.O.; DUBOVI E.J; 1987. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. Virology 158: 168-173.

DOYLE, L.G.; HEUSCHELE, W.P. 1983. Bovine viral diarrhoea infection in captive exotic ruminants. J. Am. Vet. Med. Assoc. 183:1257-1259.

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

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

ELAZHARY, M.A.; FRECHETTE, J.L.; SILIM, A.; ROY, R.S. 1981. Serological evidence of some bovine viruses in the Caribou (*Rangifer tarandus caribou*) in Quebec. J. Wildl. Dis. 17: 609-612.

EVERMANN, J.F.; BERRY, E.S.; BASZLER, T.V. 1993. Diagnostic approaches for the detection of bovine viral diarrhoea virus and related pestiviruses. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 265-269.

EVERMANN, J.F. 2006. Pestiviral infection in llamas y 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. [en línea]. <<http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/animal/paises/pdf/2914chi.pdf>> [consulta: 23/03/07].

FREDRIKSEN, B.; SANDVICK, T.; LOKEN, T., ODEGAARD, A. 1999. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. Vet. Rec. 30: 111-114.

FROLICH, K.; HOFFMANN, N.M. 1995. Isolation of bovine viral diarrhoea virus-like pestivirus from roe deer (*Capreoleus capreoleus*). J. Wild. Life. Dis. 31: 243-246.

GALAZ, J.L. 2005. Antecedentes de la especie. **In:** Galaz, J.L. y González, G. (Eds.). Técnicas para el Manejo Productivo de la Vicuña (*Vicugna vicugna* Molina, 1782) en Chile. Corporación nacional Forestal – Fundación para la Innovación Agraria (CONAF - FIA). Santiago, Chile. pp. 23-37.

GIANGASPERO, M.; R, HARASAWA. 1999. Ovine pestiviruses: their taxonomic status revealed by palindromic nucleotide substitutions. Vet. Microbiol. 70: 33-39.

GIOVANNINI, A.; CANCELLOTTI, F.M.; TURILLI, C.; RANDI, E. 1988. Serological investigations for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (*Cervus dama*) and wild boar (*Sus scrofa*) on the San Rossore Preserve. Tuscany, Italy. J. Wildl. Dis. 24: 127-132.

GROOMS, D.L. 2004. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. Vet. Clin. Food Anim. Pract. 20: 5-19.

GUTEKUNST, D.E.; MALMQUIST, W.A. 1964. Complement-fixing and neutralizing antibody response to bovine viral diarrhoea and hog cholera antigens. *Can. J. Com. Med. Vet. Sc.* 28: 19-23.

HAMBLIN, C.; HEDGER, R.S. 1979. The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in African wildlife. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2: 295-303.

HAMERS, C.; COUVREUR, B.; DEHAN, P. 2000. Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea viral strains isolated from haemorrhagic syndrome. *Vet. J.* 160: 250-258.

HAMILTON, A.; TIMONEY, P.J. 1972. BVD virus and "Border disease". *Vet. Res.* 91: 468- 469.

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

HARDING, M.J.; CAO, X.; SHAMS, H. 2002. Role of bovine viral diarrhoea virus biotype in the establishment of fetal infections. *Am. J. Vet. Res.* 63: 1455-1463.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. 1995. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11: 521- 528.

HOWARD, C.J. 1990. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech. Of. Int. Epiz.* 9: 95-103.

HUGHES, L.E.; KERSHAW, G.P.; SHAW, I.G. 1959. B or Border disease. An undescribed disease of sheep. *Vet. Rec.* 71: 313-317.

INE. (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS). 1997. VI Censo agropecuario. Resultados preeliminares. Ed. José Cayuela. Santiago, Chile. 443p.

KARESH, W.B.; UHART, M.M.; DIERENFELD, E.S. 1998. Health evaluation of free- ranging guanaco (*Lama Guanaco*). *J. Zoo Wildl. Med.* 29: 134-141.

KARSTAD, L. 1981. Bovine viral diarrhoea virus. In: Davis, J.W, L.H., Trainer, D.O. (Eds.). *Infectious Diseases of Wild Mammals*. 2th Ed. Iowa State University Press, Iowa. U.S.A. pp 209-211.

KOFORD, C. 1957. The vicuña and the puna. *Ecol. Mon.* 27: 152-219.

LARSSON, B.; FOSSUM, C. 1992. Bovine virus diarrhoea virus induces in vitro a proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from cattle immunized by infection. *Vet. Microbiol.* 31: 317-325.

LAWMAN, M.J.P.; EVANS, D.; GIBBS, D.P.J.; MC DIARMID, A.; ROWE, L. 1978. A preliminary survey of British deer for antibody to some virus diseases of farm animals. *Br. Vet. J.* 134: 85-91.

LENETTE, E.; SCHMIDT, N. 1964. Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases. 3th Edition. American Public Health Association, Inc. New York, U.S.A. 814p.

MAC MARTIN, D.A.; SNODGRASS, D.R.; CORRIGALL, W. 1977. Bovine virus diarrhoea antibody in a Scottish deer. *Vet. Rec.* 100: 187.

MADARIAGA, I.; GALAZ, J.L. 2005. Aspectos Legales para el manejo productivo de la vicuña. In: Galaz, J.L. y González, G. (Eds.). *Técnicas para el Manejo Productivo de la Vicuña (*Vicugna vicugna* Molina, 1782) en Chile*. Corporación

Nacional Forestal – Fundación para la Innovación Agraria (CONAF - FIA).
Santiago, Chile. pp. 63-71.

MATTSON, D.E. 1994. Viral Diseases. *Vet. Clin. North.Am. Food Anim. Pract.* 10:345-351.

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

MEYERS, G.; THIEL, H.J. 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 45: 53-118.

MOENNING, V. 1990. Pestiviruses: A review. *Vet. Microbiol.* 23: 35-54.

MOTHA, M.X.J.; THAM K-M. 1992. Pestivirus infection in a llama (*Lama glama*). *N.Z. Vet. J.* 40: 126.

NUTTALL, P.A.; STOTT, E.J; THOMAS, L.H. 1980. Experimental infections of calves with two strains of bovine viral diarrhoea virus: virus recovery and clinical reactions. *Res. Vet. Sc.* 28: 91-95.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. 2000. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccine. Bovine viral diarrhoea. [en línea].

<http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/ancien_manuel/A_00115.htm> [consulta: 20/03/06].

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

OLDE RIEKERINK, R.G.M.; DOMINICI, A.; BARKEMA, H.W.; DE SMIT, A.J.; 2005. Seroprevalence of pestivirus in four species of alpine wild ungulates in the High Valley of Susa, Italy. *Vet. Microbiol.* 108: 297-303.

PARKS, J.B.; ENGLAND, J.J. 1974. A serological survey for selected viral infections of Rocky Mountain Bighorn sheep. *J. Wildl. Dis.* 10: 107-110.

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

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

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

PICTON, R. 1993. Serological survey of llamas in Oregon for antibodies to viral diseases of livestock. Master Thesis. Corvallis, Oregon State University. Oregon, USA.

PUNTEL, M.; FONDEVILA, N.A.; BLANCO VIERA J. 1999. Serological survey of viral antibodies in llamas (*Lama glama*) in Argentina. *Zentr. Vet. Med.* 46: 157-161.

QU, L.; MC MULLAN, L.K.; RICE, C.M. 2001. Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 75: 10651-10662.

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

RAGGI, L.A. 2000. Camélidos en Chile, Situación actual y perspectivas. FIA (FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA). Santiago, Chile.130 pp.

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

RAVINOVICH, J.; HERNÁNDEZ, M.; CAJAL, J. 1991. A simulation model for the management of vicuña populations. *Ecol. Mod.* 30: 275-295.

REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S.; ERNST, S.; AGUILAR, M.; ENRÍQUEZ, R.; GALLARDO, J. 1990. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea-mucosal disease in southern Chile. *Prev. Vet. Med.* 10: 73-78.

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

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

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

SANDOVAL, A. 2000. Detección de anticuerpos contra pestivirus en ovinos de distintas zonas del país. Memoria de Título. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Santiago, Chile. 36pp.

SANDVICK, T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.* 64: 123-134.

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

STAUBER, E.H.; AUTENRIETH, R.; MARKHAM, O.D.; WITHBECK, V. 1980. A seroepidemiologic survey of three pronghorn (*Antilocarpa Americana*) populations in southeastern Idaho, 1975-1977. *J. Wildl. Dis.* 16: 109-115.

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

THIEL, H.J.; PLAGEMAN, P.; MOENNING, V. 1996. Pestiviruses. In: Fields, B.N; Knipe, D.M. Howley, P.M. (Eds.). *Fields Virology*, Volumen I. 3th. Ed. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, U.S.A. pp.1059-1069.

TORRES., H. 1992. Camélidos silvestres sudamericanos. Un plan de acción para su conservación. Grupo de Especialistas en Camélidos Sudamericanos, comisión de Supervivencia de Especies. Unión Internacional para la Conservación de la naturaleza, UICN. Gland, Suiza. 120 pp.

TURNER, J.C.; PAYSON, J.B. 1982. Prevalence of antibodies of selected infectious disease agents in the peninsular desert bighorn sheep (*Ovis Canadensis cremnobates*) of the Santa Rosa Mountains. *J. Wildl. Dis.* 18: 243-245.

VAN CAMPEN, H.; FROLICH, K.; HOFMANN, M. 2001. Pestivirus infections. In: Williams, E.S.; Barker, I.K. (Eds.). *Infectious Diseases of Wild Mammals*. Manson Publishing Veterinary Press. London, England. pp. 232-237.

VERGARA, J.F. 2004. Primera detección en Chile de anticuerpos seroneutralizantes contra herpesvirus equino tipo I en camélidos sudamericanos. Memoria de Título. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Santiago, Chile. 44 pp.

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

VILCEK, S.; GRESIER-WILCKE, I.; NETTLETON P.; PATON D.J. 2000. Celular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates. *Vet. Microbiol.* 77: 129-136.

VILCECK, S.; GREISER-WILCKE, I.; DURKOVIC, B.; OBRITZHAUSER, W.; DEUTZ, A.; KOFER, J. 2003. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the south east of Austria (Styria). *Vet. Microbiol.* 91: 285- 291.

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

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

YOUSIF, A.A.; BRAUN, L.J.; SABER, M.S.; ABOELLEIL, T.; CHASE, C.C.L. 2004. Cytopathic type 2 bovine viral diarrhoea virus in dromedary camels. *Arab. J. Biotech.* 7: 123-140.