



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**PRIMERA DETECCIÓN EN CHILE DE ANTICUERPOS
SERONEUTRALIZANTES CONTRA HERPESVIRUS EQUINO TIPO 1 EN
CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS**

JOSÉ FELIPE VERGARA PROBOSTE

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

PROFESOR GUÍA: DRA. MARÍA ORFELIA CELEDÓN VENEGAS

**SANTIAGO, CHILE
2004**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
DE CIENCIAS VETERINARIAS

PRIMERA DETECCIÓN EN CHILE DE ANTICUERPOS SERONEUTRALIZANTES CONTRA HERPESVIRUS EQUINO TIPO 1 EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

JOSÉ FELIPE VERGARA PROBOSTE

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DRA. MARÍA ORFELIA CELEDÓN VENEGAS
PROFESOR CONSEJERO: DRA. JOSÉ PIZARRO LUCERO
PROFESOR CONSEJERO: DRA. LUIS ALBERTO RAGGI SAINI

SANTIAGO, CHILE
2004

INDICE

	PAGINA
- RESUMEN_____	2
- SUMMARY_____	3
- INTRODUCCIÓN_____	4
- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA_____	7
1. CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS_____	7
2. ENFERMEDADES VIRALES EN CAMELIDOS SUDAMERICANOS_____	9
3. HERPESVIRUS_____	17
- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS_____	26
- MATERIAL Y MÉTODO_____	27
- RESULTADOS Y DISCUSIÓN_____	31
- CONCLUSIÓN_____	36
- BIBLIOGRAFÍA_____	37

RESUMEN

En consideración a que: a) se desconoce si las alpacas en Chile se han infectado con el virus herpes equino tipo 1 (VHE-1) o un virus antigénicamente relacionado; b) en Chile se ha aislado el VHE-1 desde equinos naturalmente infectados; c) el VHE-1 produce una enfermedad de alto significado económico en el ganado equino; d) se ha descrito una enfermedad de importancia en asociación con una infección por virus herpes similar al VHE-1 en alpacas de Nueva York, procedentes de Chile, en este estudio se planteó detectar en forma indirecta la existencia de infección por VHE-1, o un virus antigénicamente relacionado, en camélidos sudamericanos (CS) a través de la pesquisa de animales que han respondido inmunológicamente al agente viral.

El total de muestras correspondió a 204 muestras de sueros sanguíneos, de los cuales 98 pertenecen a alpacas (*Lama pacos*); 44 a llamas (*Lama glama*); 37 a guanacos (*Lama guanicoe*); y 25 a vicuñas (*Vicugna vicugna*), procedentes de 14 rebaños de las Regiones I, IV, V, XII y Metropolitana. La presencia y cuantificación de anticuerpos se realizó mediante la prueba de seroneutralización dilución punto final (SNDPF), enfrentando diluciones en base dos del suero del animal, a 100 dosis infecciosas cultivo de tejido 50% (DICT50) del VHE-1.

Del total de muestras analizadas, 52 (25,5 %) presentaron anticuerpos seroneutralizantes para el VHE-1. La positividad por especie animal fue: 19/98 alpacas (19,4 %); 10/44 llamas (22,7 %); 9/37 guanacos (24,3 %); y 14/25 vicuñas (56 %). Los títulos de anticuerpos oscilaron entre 2,8 y 89 con una media de 10. La media fue para: las alpacas 6,1; las llamas 12; los guanacos 12; y para las vicuñas 17.

Se concluye que en el país existen CS infectados con VHE-1 o en su defecto con un virus herpes que comparte antígenos comunes con el VHE-1.

SUMMARY

In consideration to that: to) it is ignored if the alpacas in Chile have been infected with the virus herpes equine type 1 (VHE-1) or a virus related antigénic; b) in Chile the VHE-1 has been isolated naturally from equine infected; c) the VHE-1 produces an illness of high economic meaning in the equine livestock; d) an illness of importance has been described in association with an infection for similar virus herpes to the VHE-1 in alpacas of New York, coming from Chile, in this study thought about to detect in form indirect the infection existence for VHE-1, or a virus related antigenicnicly, in South American camelids (CS) through the investigation of animals that immunologicly has responded to the viral agent.

The total of samples corresponded to 204 samples of sanguine serums, of which 98 belong to alpacas (*Lama pacos*); 44 to llamas (*Lama glama*); 37 to guanacos (*Lama guanicoe*); and 25 to vicuñas (*Vicugna vicugna*), coming from 14 herds of the Regions I, IV, V, XII and Metropolitan. The presence and quantification of antibodies was carried out by means of the test of seroneutralización dilution final point (SNDPF), facing dilutions in base two of the serum of the animal, to 100 tissue cultive cells infectious doses (DICT50) of the VHE-1.

Of the total of analyzed samples, 52 (25,5%) they presented antibodies seroneutralizantes for the VHE-1. The positived for animal species was: 19/98 alpacas (19,4%); 10/44 llamas (22,7%); 9/37 guanacos (24,3%); and 14/25 vicuñas (56%). The titles of antibodies oscillated between 2,8 and 89 with a stocking of 10. The stocking was for: the alpacas 6,1; the llamas 12; the guanacos 12; and for the vicuñas 17.

You concludes that in the country CS exists infected with VHE-1 or in its defect with a virus herpes that shares antigens common with the VHE-1.

INTRODUCCIÓN

El grupo de camélidos sudamericanos (CS) se encuentra constituido por cuatro especies: la alpaca (*Lama pacos*), la llama (*Lama glama*) consideradas domésticas, además del guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*), catalogadas como silvestres (Fernández-Baca, 1991).

La población de CS de Chile no representa más del 2,6 % del total de CS existentes en los países andinos (6.885.992), donde se encuentran incluidos Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay y Perú. Para Chile, se ha estimado un número de 179.589 ejemplares, de los cuales las llamas alcanzan a 79.294; las alpacas a 45.224; las vicuñas a 27.921; y una población de guanacos que oscila entre 23.850 a 27.150 (INE, 1997).

Si bien, los CS constituyen sólo cerca del 1% de la masa ganadera total nacional, estas especies tienen un gran significado socio-cultural, pues constituyen, el principal recurso de las familias aymáras que habitan en el altiplano de la I Región, representando más del 90 % de los ingresos de esta población; así como las carnes de alpacas y llamas corresponden al 60% de los beneficios registrados en plantas faenadoras de carnes en Arica (FIA, 2000).

Se debe tener presente, que las características propias de los ecosistemas donde suelen habitar los CS son de condiciones tan adversas, en cuanto a la cantidad y calidad de recursos que utiliza para su consumo, que hacen poco probable el desarrollo eficiente de algún sistema de producción animal convencional, preconizándose que, para las diferentes zonas del territorio nacional con estas características, las diversas especies de camélidos representan oportunidades de desarrollo, mediante la producción de fibra, carne y cuero; productos que presentan interesantes perspectivas de mercado, especialmente para el de exportación (FIA, 2000).

Las actuales iniciativas en la utilización de las especies domésticas y silvestres para el desarrollo de productos de consumo, hacen necesario conocer las características fisiológicas, así como las patologías que padecen y que pueden afectar tanto a los ejemplares sometidos a manejo como aquellos de vida silvestre. La información en relación con las enfermedades virales que podrían afectar a los CS, a pesar de ser escasa, da cuenta que son susceptibles de infectarse con patógenos provenientes de otras especies, fundamentalmente del orden *Artiodactyla*, suborden *Rumantia*, familia *Bovidae* y del orden *Perissodactyla*, familia *Equidae*. Es así como, para los CS, se describen infecciones con virus que afectan a bóvidos y équidos.

En Chile, el grado de conocimiento que existe en relación a las enfermedades virales que pueden afectar a estas especies es limitado. Sólo se tienen antecedentes de infección por pestivirus en alpacas y llamas, a través de la detección de anticuerpos (Celedón *et al.*, 2001) y a través del aislamiento de pestivirus desde alpacas, llamas y guanacos con y sin signología clínica (Celedón *et al.*, 2000), a la vez que se ha detectado la presencia de alpacas persistentemente infectadas e inmunotolerantes a pestivirus (Arce, 2001). Se ha buscado la presencia de anticuerpos neutralizantes para el virus herpes bovino 1 (VHB-1) en las 4 especies de CS, sin resultados positivos (Celedón *et al.*, 2001).

Existe el antecedente que alpacas y llamas, procedentes de Chile, en Nueva York hicieron infección con un virus indistinguible del virus herpes equino tipo 1 (VHE-1), con presentación clínica de ceguera y otros signos neurológicos. Se presume que fueron infectadas al entrar en contacto con una cebrá (Rebhun *et al.*, 1988) siendo este el único antecedente que da cuenta de la susceptibilidad de infección de los CS con un virus semejante al VHE-1.

Se desconoce si los CS en Chile están infectados con VHE-1, pero ante el conocimiento de la presencia de infección con VHE-1 en el ganado equino del país, las serias implicancias de la infección con VHE-1 en los equinos y el antecedente de susceptibilidad de los CS de infectarse con un virus similar al VHE-1 en otras latitudes, se plantea pesquisar en forma indirecta la existencia de CS del país que hayan sufrido infección con VHE-1 o uno antigénicamente relacionado, a través de la detección de anticuerpos neutralizantes del VHE-1.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS.

El grupo de los CS se encuentra distribuido principalmente en los países andinos sudamericanos como Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay y Perú. Es en este último donde se concentran las mayores poblaciones de estos ejemplares. De las 4 especies que conforman este grupo, dos de ellas se consideran domésticas: alpaca (*Lama pacos*) y llama (*Lama glama*), así como dos silvestres: el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*). Todas poseen una gran importancia cultural, sociológica y económica en los pueblos ancestrales como en las poblaciones humanas actuales donde mayoritariamente estas especies se ubican (FIA, 2000).

Los ecosistemas donde mayormente habitan los CS se caracterizan por su aislamiento, clima inhóspito, y gran distancia a centros urbanos altamente poblados; en alturas entre los 4.000 a 5.500 m.s.n.m donde aún persiste la vegetación natural. Constituye una excepción el guanaco, que se encuentra con mayor presencia en la Patagonia donde las alturas bajan hasta el nivel del mar (FIA, 2000).

La población total de CS en Chile no representa más del 1% del total de la masa ganadera nacional; con una población total de 179.589 ejemplares, de las cuales las llamas se encuentran en número de 79.294, alpacas en 45.224, vicuñas en número de 27.921 y una población de guanacos entre los 23.850 a 27.150 (INE, 1997); sin embargo su importancia radica en el rol social que desempeña su ganadería especialmente en las familias aymaras de la I Región (FIA, 2000).

En cuanto a su distribución en el territorio nacional existe presencia de ejemplares en todo el territorio, pero con altas concentraciones en las regiones extremas del país. En la I Región se encuentra un 89,2% del total de alpacas y un 90,2% de las llamas. En el resto de las regiones los porcentajes no superan al 2%, excepto en la II que posee un 6,86 % de las llamas.

De la misma manera, el guanaco se encuentra presente en todo el territorio nacional, donde la mayor parte de los individuos se concentran significativamente en la XII Región del país (INE, 1997).

De las especies explotables, alpacas y llamas, así como aquellas en las cuales existen restricciones de manejo y explotación, guanacos y vicuñas, se destaca la producción de carne, fibra textil, piel y cueros, artesanías y su participación en el ecoturismo por el valor estético propio de los animales (FIA, 2000)

Al considerar el porcentaje de animales faenados, los CS alcanzan solamente el 0,15% del total nacional el cual a pesar de ser poco, supera al beneficio de ganado caprino (0,08%). Sin embargo, al analizar las cifras únicamente de los animales beneficiados en los mataderos de Arica y sin considerar el beneficio informal de ninguna especie, los CS alcanzan un 60,78% superando incluso a la suma de bovinos, ovinos y porcinos. En Chile el consumo de este tipo de carne no se ha extendido al resto del territorio (FIA, 2000).

Las fibras finas, incluyendo en este rubro la de la alpaca, representa sólo el 2,5% del total mundial de exportación de fibras de origen animal. 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, las que están constituidas por materias primas sucias, donde se encuentran mezcladas las fibras de llamas y alpacas, separadas solamente por sus colores. (FIA, 2000).

Las pieles y cueros de CS se comercializan en forma fresca o salada, siendo la mejor el de pieles de crías neonatas de madres que abortan en los últimos meses de gestación y de crías post natales que mueren por alguna razón y que son conocidos como “baby-alpaca”, muy apreciadas en algunos mercados a nivel internacional. Artesanalmente se confeccionan juguetes, tapices y artículos de vestuario. Las pieles de mejor calidad se usan para prendas de vestir, colchas y cameros o sobrecamas (FIA, 2000).

En la actualidad, las poblaciones de CS se encuentran menos difundidas que en los tiempos incaicos y preincaicos, ya que han sido desplazados por la producción de ganado ovino, caprino y bovino. Si bien históricamente la llama y la alpaca nunca han sido utilizadas dentro de un sistema agropastoril, tanto la eficiencia que presentan los CS en la producción de carne, así como el precio favorable de las fibras obtenidas, además del valor ecológico, hacen oportuno plantear la re-población con estas especies, la que debiera ir acompañada de la reducción de otros ganados, especialmente el ovino, con el cual compiten por la pradera que sustenta su alimentación (FIA, 2000).

Es sin duda un punto primordial en el desarrollo de estrategias tanto de conservación como de explotación de CS, que los aspectos de sanidad animal se encuentren considerados, siendo el conocimiento de las enfermedades que les afectan así como aquellas de las cuales podrían ser susceptibles de padecer, una área necesaria de investigar.

2. ENFERMEDADES VIRALES EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

La información acerca de las enfermedades virales que afectan y que pueden afectar a los CS es escasa. Aquellas que se encuentran descritas, se basan principalmente en datos aislados de evidencias serológicas, observaciones clínicas y anátomo-patológicas y reportes obtenidos por diagnósticos de laboratorios, sin existir información completa acerca, por ejemplo, de la susceptibilidad relativa de las especies al virus y detalles de la patogénesis de la infección (Mattson, 1994). Esta apreciación está apoyada por Fowler, 2002 (comunicación personal en Curso Internacional de Manejo y Producción del Guanaco; 13-14 y 15 de Junio de 2002. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía) quién sostiene que las enfermedades virales que afectan a los CS son muy pocas, y que aquellas propias de estas especies son casi desconocidas. No obstante, se asume que los CS son susceptibles al común de las enfermedades padecidas por rumiantes (Rivera *et al.*, 1987), lo cual cobra importancia en las actuales condiciones de tenencia donde el ganado ovino, caprino y bovino cada vez comparte con mayor frecuencia las mismas áreas de alimentación.

También se asume que las diferentes especies de CS comparten la misma susceptibilidad frente a las distintas enfermedades infecciosas. No obstante, se describe una excepción a esta generalidad, que la constituye el síndrome de inmunodeficiencia, de origen desconocido, que está descrito sólo en llamas, donde se evidencian bajos niveles de inmunoglobulinas de la clase G, asociada a una deficiencia de linfocitos B y posiblemente a linfocitos T, lo que las hace ser más susceptibles a todas las enfermedades infecciosas. (Hutchison *et al.*, 1992).

En los planteles donde se manejan CS, son reconocidas las afecciones producidas por agentes bacterianos, considerándose de importancia la leptospirosis, la tuberculosis, la brucelosis y las enfermedades provocadas por clostridios a las cuales los camélidos en general son altamente susceptibles, como carbunco bacteridiano y enterotoxemia (Theford y Jhonson, 1989).

De los agentes virales que tienen capacidad de infectar a los CS se tiene referencia de los siguientes:

Adenovirus. La mayoría de las infecciones son subclínicas pero en ocasiones la infección puede dar origen a enfermedad del tracto entérico o respiratorio (Mattson, 1994). Se ha aislado adenovirus desde cinco llamas y una alpaca con diarrea en Oregón (Estados Unidos de Norteamérica). El examen histopatológico mostró una severa enteritis necrotizante y colitis así como la presencia de numerosos cuerpos de inclusión en células epiteliales del tracto digestivo (Mattson, 1994). También fue aislado un adenovirus desde el pulmón de una llama con neumonía y hepatitis (Galbreath *et al.*, 1994). En un estudio de seroprevalencia sobre 270 llamas de 21 ranchos de Oregón, se determinó que el 93 % de los ejemplares poseían anticuerpos para una especie de adenovirus (Picton, 1993). En Perú se detectó seropositividad para adenovirus en alpacas (Rivera *et al.*, 1987).

Coronavirus (CV) y Rotavirus (RV). CV ha sido detectado en heces de llamas con diarrea, mediante microscopía electrónica (Mattson, 1994). Se investigó la presencia de CV y RV en dos poblaciones de guanacos con diarrea severa, capturados en la patagonia Argentina. En ausencia serológica y virológica de CV, se aisló RV en un guanaco recién nacido con diarrea, de cada población, y se detectó un 95% de los animales muestreados seropositivos a RV (Parreño *et al.*, 2001). En Perú se detectó seropositividad para coronavirus y rotavirus en alpacas (Rivera *et al.*, 1987).

Virus parainfluenza 3 (VPI-3) y virus sincicial respiratorio (VSR). Ambos virus son agentes causales de enfermedad respiratoria en bovinos. Aunque no existen reportes de casos de enfermedad con signos clínicos asociado a infección con VPI-3 o VSR, se ha encontrado serología positiva para estos virus en Perú (Rivera *et al.*, 1987). Además se cuenta con el registro, en el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, de un VPI-3 aislado de un guanaco de 8 meses muerto con enfermedad respiratoria aguda (Celedón, 2003; comunicación personal).

Virus de la de neumonía progresiva ovina (VNPO). El VNPO pertenece a una especie viral de los retrovirus. Un estudio en Oregón determinó que 9 de 270 llamas analizadas presentaban anticuerpos para el VNPO (Picton, 1993). En otro estudio serológico conducido en una región del Perú, donde existe la presencia del VNPO, en alpacas que pastaban junto a ovejas, no se detectaron anticuerpos para el virus neumonía progresiva ovina (Rivera *et al.*, 1987).

Virus de la fiebre aftosa. La enfermedad ha sido descrita en alpacas en contacto con bovinos afectados en un brote epizootico en Perú. Las lesiones vesiculares observadas se presentaron principalmente en la lengua. Los signos clínicos de la enfermedad, la distribución de las lesiones y los cambios patológicos fueron similares a los observados en otras especies de animales domésticos, sin embargo algunas llamas y alpacas en las cuales se pudo demostrar la presencia del virus en sus secreciones orales, no presentaron signos clínicos de enfermedad, (Mancini, 1952; Moro, 1971a). De los estudios se concluye que los

CS son más resistentes a la infección viral que bovinos y ovinos (Mattson, 1994). En 1987, se detectó seropositividad para virus de la fiebre aftosa en alpacas del Perú, sin enfermedad clínica (Rivera *et al.*, 1987).

Virus estomatitis vesicular (VSV). Por infección experimental se ha demostrado que las alpacas son susceptibles al VSV; los signos clínicos observados consisten en pirexia transitoria y anorexia así como aparición de vesículas en el sitio de inoculación (dorso de la lengua), no obstante, señalar que los CS no se infectan con el VSV en forma natural (Gómez, 1964). En Perú se detectó seropositividad para virus estomatitis vesicular en alpacas (Rivera *et al.*, 1987).

Virus del ectima contagioso ovino (VEC). Una especie de poxvirus responsable de ectima contagioso de los ovinos, también infecta a los CS. Los CS afectados desarrollan las lesiones proliferativas típicas en la epidermis de las comisuras de la boca, las que pueden extenderse al resto de la cara y periné (Moro, 1971b; Ramírez, 1971). La enfermedad puede presentarse de curso más crónico que en el ganado ovino y afectar, además, áreas de la piel de manera semejante a la infestación por sarcoptes (Fowler, 1989). En Perú se detectó seropositividad para virus ectima contagioso en alpacas (Rivera *et al.*, 1987)

Virus de la lengua azul (VLA). El orbivirus es el responsable de la lengua azul de bovinos y ovinos. En Perú, se estableció que el 21 % de 114 alpacas analizadas presentaron anticuerpos para este virus (Rivera *et al.*, 1987). En Oregon el 1,5 % de 270 llamas tuvieron anticuerpos para este virus, en zonas donde el virus no se presenta de manera enzoótica en el ganado bovino (Picton, 1993). No se ha detectado signos clínicos de la enfermedad en alpacas y llamas adultas, así como no se ha evidenciado efectos abortígenos ni teratogénicos en infecciones fetales (Mattson, 1994).

Virus de la Influenza A. En Perú se detectó seropositividad para virus de influenza A en alpacas (Rivera *et al.*, 1987).

Retrovirus. Por microscopía electrónica y detección de actividad de transcriptasa reversa, se detectó la presencia de retrovirus, en tejido pulmonar de una llama eutanasiada que sufría de anorexia con pérdida de peso, rigidez de los miembros y anomalías hematológicas: anemia y linfopenia, asociándose la presencia del virus al efecto de inmunodepresión (Underwood *et al.*, 1992)

Virus del Oriente del Nilo (VON). Recientemente (Yaeger, 2002), reporta que en el estado de Iowa, Estados Unidos de Norteamérica, en una alpaca con signos clínicos de tortícolis, ataxia, postración y quejidos, 3,5 días previos a su muerte, se detectó la presencia de genoma del VON en sus tejidos. También da cuenta de 2 llamas de Connecticut en el año 2000 y una en Massachusetts, en el 2001, sin un estado clínico conocido, fueron diagnosticadas como positivas a VON.

Virus diarrea viral bovina (VDVB). A través de estudios serológicos se ha establecido que los CS son susceptibles a la infección con VDVB (Doyle y Heuschele, 1983; Motha y Tham, 1992). En Perú, de 117 alpacas que pastaban con ovinos y bovinos el 11% presentó anticuerpos para el VDVB (Rivera *et al.*, 1987); en Oregon de 271 llamas procedentes de 21 rebaños, la presencia de anticuerpos estuvo en un 4,4% de los animales (Picton, 1993); en tanto que en Chile de un total de 74 alpacas y 43 llamas procedentes de distintos rebaños ubicados en la Región Metropolitana en 10,8% de las alpacas y 14% de las llamas, se pesquisó anticuerpos para el VDVB no habiéndose detectado seropositividad para estos virus en 48 guanacos de la XII Región, ni en 34 vicuñas del altiplano de la I Región (Celedón *et al.*, 2001); en la mayoría de los casos, la infección podría atribuirse al contacto con el ganado bovino ya que en ellos se describe una alta tasa de infección demostrada por prevalencias serológicas que superan el 60 % (Reinhardt *et al.*, 1990; Celedón *et al.*, 1996; 1997) o también por contacto con ganado ovino o caprino, donde recientemente se conoce que ambas especies también se encuentran infectadas con el VDVB (Müller, 2003).

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). En Chile se ha identificado la presencia del VDVB en alpacas, llamas y guanacos muertos sin un diagnóstico clínico, muertos con signos de enfermedad respiratoria, hembras que han abortado y de animales sin signos clínicos de enfermedad, ubicados en la Región Metropolitana, en tanto que no se identificó la presencia de pestivirus en muestras de vicuñas del altiplano de la I Región ni en guanacos de la XII Región (Celedón *et al.*, 2000). En Chile, también se ha detectado la presencia de alpacas portadoras e inmunotolerantes al VDVB en un rebaño que sufrió un brote de abortos (Arce, 2001). No obstante, en Argentina, por inoculación experimental de llamas, con aislados de VDVB, no se produjo enfermedad, a la vez que la respuesta de anticuerpos seroneutralizantes fue pobre (Wentz *et al.*, 2003), apoyando esta experiencia está lo observado por Mattson (1994), que señala que los CS no son frecuentemente infectados con VDVB y las alpacas y llamas serían relativamente resistentes a la infección y/o el virus sería producido en baja concentración haciendo ineficiente el proceso de transmisión viral en esta especie.

Virus herpes bovino tipo 1 (VHB-1). El VHB-1, es agente causal de la rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB) en el ganado bovino, pero el rol del VHB-1 como causal de enfermedades en CS no es claro. Por medio de serología en Perú se logró establecer un 5 % de seroprevalencia para alpacas que se encontraban en contacto con ganado bovino, (Rivera *et al.*, 1987). En Oregon, sólo 2 de 270 llamas fueron positivas a la detección de anticuerpos para el VHB-1 (Picton, 1993). Mattson (1994), describe el aislamiento de VHB-1 y la detección de éste a través de la prueba de anticuerpos fluorescentes desde tres casos de bronconeumonía en llamas, y la detección de un caso de enfermedad neurológica aguda con una marcada acumulación perivascular de linfocitos en el tejido cerebral consistente con el diagnóstico de encefalitis difusa no supurativa. En Chile en una muestra de 199 sueros de CS: 74 alpacas, 43 llamas, 48 guanacos y 34 vicuñas; no se logró detectar la presencia de anticuerpos seroneutralizantes para VHB-1 (Celedón *et al.*, 2001).

Virus herpes equino tipo 1 (VHE-1). Existen antecedentes que hacen sospechar de la infección con VHE-1 de alpacas y llamas, procedentes de Chile, en Nueva York, con presentación clínica de ceguera y otros signos neurológicos, debido al hecho de que un virus serológicamente indistinguible al VHE-1 fue aislado desde tres alpacas y una llama, clínicamente sanas, del rebaño. Se presume que la fuente de contagio fue una cebra, la que estuvo en contacto con las alpacas y llamas, aproximadamente 45 días previos a la detección de la enfermedad (Rebhun *et al.*, 1988). Cerca del 20% de las alpacas y llamas desarrollaron ceguera, con signos de disfunción neurológica en 4 de los animales ciegos; de éstos sólo dos tuvieron resultados fatales asociados a la enfermedad. Las lesiones oculares fueron variables, desde aquellas donde no se distinguía lesión ni anormalidades, hasta severas corio-retinitis hemorrágicas con desprendimiento de retina y vitritis. Tanto la corio-retinitis como una neuritis del nervio óptico retro-bulbar fueron establecidas como causales de la ceguera evidenciada. De este brote, 6 alpacas fueron observadas por un período de 6 meses sin apreciarse variaciones en la manifestación clínica. Apoya la participación del VHE-1, el hecho de que en un estudio posterior, tres llamas fueron experimentalmente inoculadas con el VHE-1 aislado del cerebro de una alpaca con enfermedad neurológica severa (House *et al.*, 1991), pudiendo confirmarse el potencial patogénico del virus, ya que una murió, otra fue sacrificada en estado moribundo y la tercera sufrió una enfermedad neurológica moderada. En los tres casos fue imposible replicar los signos de corio-retinitis hemorrágicas, desprendimiento de retina, vitritis y neuritis del nervio óptico retro-bulbar con la consecuente ceguera. Lo más importante de este estudio fue demostrar las diferencias básicas entre la infección por VHE-1 en camélidos y equinos. En los CS el virus replica en las células de la membrana mucosa de la cavidad nasal, desde donde adquiere acceso al nervio olfatorio. La infección progresa hasta el nervio óptico y sistema nervioso central. En equinos, la replicación inicial del virus seguida por la viremia o distribución del virus a través del cuerpo se desarrolla por los macrófagos infectados. El cuadro neurológico que pueden realizar algunos equinos infectados, se debe principalmente a una vasculitis del cordón espinal. Los signos clínicos usualmente incluyen paresia, paraplejia, e incontinencia fecal o urinaria.

Un estudio serológico efectuado en llamas, en Oregón, que buscaba detectar la presencia de anticuerpos para varios virus que afectan al ganado ovino, bovino y de equinos, determinó que sólo una de 270 llamas analizadas fue positiva al VHE-1, sin evidenciar signos clínicos de estar infectada (Picton, 1993).

Hasta la fecha, no existen reportes concernientes a la significación etiológica que pueda tener el VHE-1 como inductor de enfermedad fetal, muerte perinatal y aborto en CS, como ocurre en el equino.

Bajo el concepto de que el VHE-4 está estrechamente emparentado con el VHE-1, siendo el responsable del cuadro respiratorio de rinoneumonitis en los equinos; y que comparte antígenos comunes con el VHE-1 (Allen y Bryans, 1986), no se descarta la posibilidad de que los CS también hagan infección con el VHE-4. Por otra parte, el virus herpes asinino-3 (VHA-3), el virus del asno (Ficorilli *et al.*, 1995); y el virus herpes equino 9 (VHE-9), virus aislado de gacelas Thomson (*Gazella thomsoni*) con encefalitis fulminante (Fukushi *et al.*, 1997), además de presentar antígenos comunes con el VHE-1, también podrían compartir como hospederos a los CS.

3. HERPESVIRUS

Familia *Herpesviridae*. Los herpesvirus se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, de esta manera no sólo afectan a mamíferos y aves, sino además a anfibios, reptiles e insectos. Estos virus producen lesiones en el hombre y los animales, que van desde erupciones vesiculares localizadas en epitelios superficiales, hasta daño difuso y generalizados en las mucosas de los tractos respiratorios, digestivos y genital. De modo similar, el rango de lesiones puede ir desde proliferación de células gigantes localizadas en epitelio glandular a necrosis de hígado, nódulos linfoides y otros tejidos; y desde daño neuronal específico a meningoencefalitis difusa (Murphy *et al.*, 1999).

Las enfermedades asociadas a la infección con los agentes pertenecientes a esta familia, se presentan principalmente en condiciones de estabulación, donde existe una concentración de animales que permite la transmisión de las partículas víricas cuyas características dicen relación con ser muy lábiles fuera del organismo y que requiere para su contagio el contacto físico directo que conlleve la aposición de epitelios húmedos o a la diseminación de aerosoles respiratorios. De esta manera, en los sistemas productivos, sobre todo aquellos de carácter intensivo, los estornudos y aerosoles de corto alcance son importantes modos de transmisión. (Murphy *et al.*, 1999). Los herpesvirus estudiados hasta la fecha son capaces de producir infecciones persistentes en su hospedador natural, dejando la información genética en estado de latencia al interior de la célula infectada, a partir de la cual los virus se reactivan y diseminan periódicamente pudiendo hacerlo incluso en forma continua. De esta forma las infecciones se perpetúan por generaciones sin necesariamente producir enfermedad con manifestación clínica en todos los animales infectados (Murphy *et al.*, 1999).

Clasificación de la familia *Herpesviridae*. La familia *Herpesviridae* presenta divisiones basadas en las propiedades biológicas de los virus que la componen, de esta manera se han establecido tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* (Murphy *et al.*, 1995).

La subfamilia *Alphaherpesvirinae* se caracteriza porque sus miembros poseen un rango variable de huéspedes, son altamente citopáticos, presentan un ciclo replicativo corto y frecuentemente establecen una infección latente en los ganglios nerviosos (Murphy *et al.*, 1995).

Muchos alphaherpesvirus producen lesiones localizadas, principalmente en la mucosa de los tractos respiratorios y genital o de la piel, caracterizada por la producción secuencial de vesículas, pústulas y úlceras superficiales que se recubren de una pseudomembrana, las cuales se curan normalmente tras 10 a 14 días sin que se formen costras. La infección generalizada por alphaherpesvirus se caracteriza por la presencia de focos necróticos en casi todos los órganos y tejidos en los animales infectados menores de tres meses y en ausencia de inmunidad conferida por los anticuerpos maternos. En animales de mayor edad, la viremia asociada a células mononucleares permite la transmisión del virus a través de la placenta produciendo aborto y lesiones necróticas diseminadas en el feto (Murphy *et al.*, 1995).

La subfamilia *Betaherpesvirinae* está integrada por virus citomegálicos de crecimiento lento, no producen lisis celular y que hacen latencia en las glándulas secretorias, tejido linforeticular y riñón. Se incluyen los citomegalovirus del hombre y diferentes especies domésticas que aunque las infecta, no representa enfermedad clínica a excepción del cerdo donde se produce un cuadro respiratorio asociado a rinitis (Murphy *et al.*, 1995).

La subfamilia *Gammaherpesvirinae* está formada por virus que infectan linfocitos donde hacen latencia. Algunos están asociados con transformación oncogénica de los linfocitos (Murphy *et al.*, 1995). En esta última subfamilia se encuentra el virus herpes humano Epstein – Barr (virus herpes tipo 4), varias especies virales que infectan a primates, el virus herpes ovino tipo 2 causante de la fiebre catarral maligna del bovino, virus que infectan a cérvidos, o a pequeños roedores, entre otros (Murphy *et al.*, 1995).

Dentro de cada una de las subfamilias virales se han podido establecer géneros, en base a sus características genómicas y antigénicas.

Propiedades de los herpesvirus. En cuanto a las propiedades de los herpesvirus, el virión tiene un tamaño aproximado de 150 nm y posee una envoltura. El ADN se encuentra rodeado por la cápside de 100 nm de diámetro que presenta simetría icosaédrica, compuesta por 162 capsómeros: 150 hexámeros y 12 pentámeros (Murphy *et al.*, 1995).

Alrededor de la cápside existe una capa de material globular conocida como tegumento, rodeada por una estructura lipoproteica típica en la que se localizan los peplómeros glicoproteicos. Debido a la naturaleza de la envoltura, el virión es ligeramente pleomórfico y su diámetro puede variar desde los 120 a 200 nm. La partícula vírica contiene más de 30 proteínas estructurales, de las cuales 6 de ellas se encuentran en la nucleocápside y 2 de éstas asociadas al ADN. Al menos 12 glicoproteínas están ubicadas en la envoltura, algunas se proyectan como peplómeros; son responsables de la adsorción del virus a la célula que van a infectar; presentan antígenos que son comunes a otros miembros de la familia; presentan antígenos que son propios para la especie viral; y participan como antígenos neutralizables en la respuesta inmune mediada por anticuerpos (Murphy *et al.*, 1999).

El genoma de los herpesvirus se compone de una molécula de ADN lineal de doble cadena. Esta molécula ADN es altamente variable entre las diferentes especies virales, tanto en su composición, tamaño y estructura, pudiendo incluso alcanzar porcentajes de guanina más citosina (G+C) entre el 32 y 74 %, variabilidad que sobrepasa con mucho a la observada en el ADN de todos los eucariontes.(Murphy *et al.*, 1995).

A través del estudio con enzimas de restricción, se han podido elaborar mapas físicos basados en el patrón de fragmentos de ADN digeridos con las endonucleasas de restricción. Esto ha permitido demostrar la existencia de tipos virales que producen enfermedades relacionadas (Murphy *et al.*, 1999).

En cuanto a la replicación viral, probablemente tanto los gammaherpesvirus como los betaherpesvirus, siguen el patrón de los alphaherpesvirus, donde éste tras su adsorción a los receptores de las células del hospedador por medio de las glicoproteínas de los peplómeros de la envoltura, la nucleocápside penetra en el citoplasma mediante la fusión de la envoltura de la membrana celular o a través de vacuolas fagocíticas. En ese momento es cuando se libera de la núcleo cápside un complejo ADN – proteína que pasa al núcleo de la célula infectada (Murphy *et al.*, 1999).

La polimerasa II dependiente del ADN celular, transcribe al menos tres clases de ARN (alpha, beta y gamma) según una secuencia coordinada y regulada. De esta forma, cuando el ARN alpha (inmediato) es procesado adecuadamente a ARNm, se traduce en la formación de proteínas que inician la transcripción del ARNm beta (precoz) que determinan la generación de proteínas beta, las cuales terminan con la transcripción del ARNm alpha. El ARN en ese momento comienza la transcripción del ADN vírico, en el cual se utilizan algunas proteínas alphas y betas (las cuales en su gran mayoría son enzimas), así como proteínas propias de la célula hospedadora. De esta manera, el programa de transcripción se pone en marcha de nuevo y el resultante ARNm gamma (tardío), transcrito a partir de secuencias distribuidas por todo el genoma, se traduce en

proteína gamma (las cuales en su gran mayoría son estructurales). Durante este proceso, se traducen más de setenta proteínas codificadas por el virus (Murphy *et al.*, 1999).

A través de un mecanismo de “círculo rotatorio”, el ADN vírico se replica en el núcleo orientándose el genoma de forma circular mediante la unión de las secuencias terminales. El ADN recién sintetizado es introducido dentro de cápsides inmaduras preformadas. Tanto la síntesis de ADN, ARN y proteínas celulares, se reduce a medida que comienza la biosíntesis vírica, cesando tres a cinco horas después de iniciada la infección (Murphy *et al.*, 1999).

La maduración conlleva a la encapsidación del ADN en nucleocápsides así como a la asociación de éstas con zonas alteradas de la porción interna de la membrana nuclear. De esta manera, la nueva partícula viral, adquiere su envoltura en el proceso de salida del núcleo, pudiendo producir cada célula infectada hasta 105 nuevas partículas virales. Los viriones maduros se acumulan dentro de vacuolas citoplasmáticas pudiendo ser liberadas lentamente a través de fusión de membranas vacuolares, exocitosis o bien mediante la lisis de la célula (Murphy *et al.*, 1999).

Infecciones por herpesvirus en equinos. Los equinos pueden hacer infección con cinco virus herpes diferentes; el virus herpes equino tipo 1 (VHE-1), el virus herpes equino tipo 3 (VHE-3) y el virus herpes equino tipo 4 (VHE-4) pertenecientes a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, que producen cuadros clínicos de importancia. El virus herpes equino tipo 2 (VHE-2) y el virus herpes equino tipo 5 (VHE-5) que pertenecen a la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, no tienen mayor importancia desde el punto de vista clínico (Murphy *et al.*, 1999).

La infección por VHE-3 provoca el exantema coital equino. Este herpesvirus no presenta reacciones cruzadas con otros virus de la familia demostrado mediante la técnica de neutralización aunque comparte algunos antígenos con VHE-1 demostrable por fijación del complemento e inmunofluorescencia (Murphy *et al.*, 1999).

El exantema coital equino es un proceso agudo y generalmente benigno, caracterizado por la formación de lesiones pustulares y ulcerativas sobre la mucosa vaginal y el vestíbulo, región perineal y ocasionalmente en los pezones de las hembras; sobre la piel del pene y prepucio en el macho. El curso de la enfermedad es extremadamente agudo con un período de incubación tan corto como 2 días y una curación completa tras 14 días en ausencia de complicaciones. En aquellos ejemplares donde la vulva, pene y prepucio es de color negro, permanecen de por vida puntos despigmentados, poniendo en evidencia la presencia de portadores potenciales. A pesar de que las lesiones genitales son extensas, pueden fácilmente pasar desapercibidas. Tanto el aborto como la infertilidad no han sido asociadas con VHE-3 de manera natural. Además del exantema, puede producir infecciones subclínicas en caballos jóvenes y ha sido aislado a partir de lesiones vesiculares localizadas en los ollares de potros en contacto con yeguas infectadas (Murphy *et al.*, 1999).

El VHE-4 es considerado como el agente más importante de procesos respiratorios agudos en caballos jóvenes hasta el primer año de edad. Este produce fiebre, anorexia y una profusa descarga nasal serosa que posteriormente pasa a mucopurulenta. La mayoría de los afectados se recuperan totalmente y son frecuentes las infecciones leves o subclínicas. Tanto la presentación de bronconeumonía y muerte de potrillos se asocia a condiciones de estrés, hacinamiento e infecciones secundarias por falta de higiene. Como fuente de virus y contaminación se considera a los animales adultos, que eliminan tras la reactivación de virus latentes. Los anticuerpos inducidos por VHE-4 reaccionan frecuentemente con el VHE-1 y viceversa (Murphy *et al.*, 1999).

Infeción por VHE-1 en equinos. El VHE-1 es la principal causa de abortos en los équidos, que pueden presentarse como epizootias y que ocasionalmente produce rinoneumonitis. También se le considera causante de mortalidad perinatal y algunas cepas producen encefalitis de forma esporádica (Campbell y Studert, 1983). La ubicación del virus de la rinoneumonitis equina en la familia de los herpesvirus se basó en estudios comparativos de la morfología viral y de las características bioquímicas y biológicas con el virus herpes simplex humano, preliminarmente catalogado como tal, denominándosele

como VHE-1, siendo el caballo y la mula las especies más susceptibles a la infección natural (Allen y Bryans, 1986).

La primera presentación clínica observada fue a comienzos de 1922, año en el que se presentó un gran brote de abortos equinos en Kentucky (Estados Unidos de Norteamérica) (Dimock y Edwards, 1933). En la década del 30 se asoció el aborto con la presentación respiratoria, al observar que las hembras equinas preñadas abortaban meses después del cuadro clínico respiratorio. Por diversos estudios se logró demostrar que los agentes causantes de los abortos y de la enfermedad respiratoria eran semejantes (Doll *et al.*, 1954). La asociación entre el VHE-1 y mieloencefalitis se reportó por primera vez en 1966, cuando se aisló el virus de tejido nervioso de animales con parálisis (Saxegaard, 1966). La presentación de cuadros encefalíticos ha sido reportada cada vez con mayor frecuencia, en forma independiente o asociada a cuadros respiratorios (Berríos y Celedón, 1992; Perl *et al.*, 1997).

La rinoneumonitis equina en su presentación respiratoria cursa como una enfermedad epidémica especialmente en la población de potrillos después del destete y durante los meses de otoño e invierno, en su primer año de vida. El período de incubación es de 2 a 10 días. Existe fiebre, congestión nasal y de la membrana mucosa conjuntival, rinitis serosa, faringitis, traqueobronquitis, anorexia, posteriormente descarga nasal mucopurulenta y tos. Las infecciones bacterianas secundarias, generalmente por estreptococos, pueden producir complicaciones graves como neumonías, pleuritis y enteritis. Los casos no complicados se resuelven en forma natural entre 4 y 8 días (Campbell y Studdert, 1983). Desde un punto de vista patológico, en la enfermedad respiratoria se observa edema, congestión y petequias en la membrana mucosa nasal; hiperplasia linfoide en la faringe; petequias en los nódulos linfáticos regionales y pequeñas áreas de consolidación en los lóbulos apicales del pulmón (Campbell y Studert, 1983).

El aborto ocurre en forma espontánea, sin signos previos. La muerte del feto ocurre poco antes del aborto, de manera que el feto no está descompuesto, lo que facilita el diagnóstico. El aborto puede ocurrir entre los 14 y 120 días después de la infección con el VHE-1; la mayoría de los abortos se produce entre los 6 y 11 meses de gestación, siendo el 10° mes el más común (Doll y Bryans, 1962). El feto abortado presenta frecuentemente decoloración amarillenta en zonas blancas de la piel, membranas mucosas y principalmente cascós. En el 90 % de los fetos se presenta edema de los pulmones y aumento del líquido pleural. También hay edema subcutáneo, y acumulación de líquido en la cavidad peritoneal, lo que distiende el abdomen. A veces se observa hemorragias en el pericardio, peritoneo y submucosa intestinal (Westerfield y Dimock, 1946).

En brotes de abortos que se producen tardíamente en la época de pariciones, nacen potrillos infectados débiles, que mueren dentro de las 24 horas, con severos signos respiratorios; algunos nacen sanos para enfermar y morir 2 a 3 días después. Las lesiones macroscópicas más llamativas se ubican en los pulmones que aparecen voluminosos y firmes, observándose alveolitis no supurativa, bronquitis y bronquiolitis necrotizante (Hartley y Dixon, 1979).

El síndrome neurológico se puede presentar en animales de cualquier edad apreciándose, después de un periodo de incubación de 7 días, incoordinación, ataxia o imposibilidad de mantenerse en pie. El mecanismo patogénico del VHE-1 en el sistema nervioso central no es bien comprendido. Este virus no es neurotrópico. Las lesiones primarias afectan al endotelio de los vasos sanguíneos del sistema nervioso central, provocando vasculitis, hemorragias y trombosis; las áreas de necrosis que se observan en cerebro y médula serían secundarias a estas alteraciones vasculares (Stierstorfer *et al.*, 2002)

Infección por VHE en Chile

En Chile, la rinoneumonitis equina se reportó por primera vez en el último trimestre de 1969, con un gran brote de abortos que duró hasta 1976, causando serias pérdidas económicas en la hípica nacional. El uso sistemático de una vacuna preparada con virus vivo modificado, iniciado con carácter experimental a fines de 1974 y continuado desde 1976, con la autorización oficial del Servicio Agrícola y Ganadero, es coincidente con la disminución gradual de los casos de abortos registrados en la zona central del país. Solamente en 1984 se detectó la enfermedad en la zona sur, al aislarse el VHE-1 desde casos de abortos ocurridos en Victoria, IX región. (Berríos y Celedón, 1992). A la fecha no hay otras descripciones referidas a virus herpes en el ganado equino en el país.

El poder identificar si existe infección por un virus antigénicamente relacionado al VHE-1 en los CS del país, tiene importancia tanto para la determinación de estos como posibles reservorios de la enfermedad para el ganado equino, así como el aportar antecedentes y contribuir al conocimiento de las patologías que pueden afectar a los CS en Chile.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Existe infección por virus antigénicamente relacionados al virus herpes equino tipo 1 (VHE-1) en camélidos sudamericanos en el país.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento acerca de las patologías que afectan a camélidos sudamericanos en Chile.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Detectar la presencia de anticuerpos seroneutralizantes para virus antigénicamente relacionados al virus herpes equino tipo 1 (VHE-1) en camélidos sudamericanos en Chile.

MATERIAL Y METODO

MUESTRAS

Asumiendo que el 1% de los animales de la población de CS en Chile poseen anticuerpos seroneutralizantes para el VHE-1; trabajando con un 95% de confianza, para encontrar a lo menos un animal positivo, se determinó un tamaño mínimo de 149 muestras de CS (Thrusfield, 1986). El total real de muestras analizadas correspondió a 204 sueros, de los cuales 98 pertenecen a alpacas; 37 a guanacos ; 44 a llamas y 25 a vicuñas, procedentes de 14 rebaños de las Regiones I, IV, V, XII y Metropolitana, encontrándose conservados en volumen de 0,5 a 1 ml en tubos Eppendorf ® a -20° C y previamente inactivados en la Unidad de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, hasta el momento de realizar la prueba de seroneutralización (Cuadro N° 1).

PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN

La seroneutralización, dilución punto final (SNDPF) consiste en mezclar el suero problema de cada animal, en diluciones base dos, con una cantidad fija de virus, 100 dosis infectantes cultivo de tejido 50% (100 DICT50). La capacidad del suero para impedir la multiplicación viral sobre un cultivo celular susceptible de ser infectado se expresa como la ausencia de efecto citopático sobre las células. Así que, si el suero no posee anticuerpos seroneutralizantes para el virus, se produce la lisis celular por acción de las 100 DICT50 del virus. Si se inhibe la acción viral, la capacidad neutralizante del suero demuestra la presencia de anticuerpos, pudiendo dicha capacidad ser cuantificada (Schmidt, 1964).

Células. Para la ejecución de la prueba de seroneutralización se empleó la línea celular Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) (Shannon, 1972), la cual se cultivó en Medio Esencial Mínimo (MEM) (GIBCO BRL® Cat N° 61100-053), adicionado con un 0,2 % de bicarbonato de sodio; 100 ug de estreptomycin y 100 U.I. de penicilina por cada ml de medio; y ajustado a pH 7,0 con ácido clorhídrico 0,1 N. Como factor de crecimiento celular se usó suero fetal bovino comercial gamma irradiado (GIBCO BRL® Cat N°

98-4018DJ) a una concentración de un 8%.

Cuadro N° 1

Procedencia y número de muestras de sueros de camélidos sudamericanos recolectadas para pesquisar la presencia de anticuerpos seroneutralizantes para el virus herpes equino tipo 1

Especie	Procedencia	Región	N° de muestras
Alpaca	Predio A1	Metropolitana	10
	Predio A2	Metropolitana	2
	Predio A3	Metropolitana	3
	Predio A4	Metropolitana	60
	Predio A5	V	7
	Predio A6	Metropolitana	16
Total			98
Guanaco	Predio G1	IV	2
	Predio G2	XII	35
Total			37
Llama	Predio LL1	Metropolitana	3
	Predio LL2	Metropolitana	11
	Predio LL3	Metropolitana	23
	Predio LL4	Metropolitana	5
	Predio LL5	Metropolitana	2
Total			44
Vicuña	Predio V1	I	25

Virus. Se empleó una cepa de referencia de uso para diagnóstico de anticuerpos de VHE-1 en equinos (aportados gentilmente por el Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura); la cual se cultivó y se midió su capacidad de infección en la línea celular MDBK, almacenándose en alícuotas dispuestas en tubos criogénicos a -60°C.

Para la titulación viral se realizaron diluciones, de la suspensión viral, en base 10 desde 1:10 a 1:10⁶ agregándole 25 ul de cada dilución viral en cada uno de dos pocillos de una microplaca (CELLSTAR ®) de 96 pocillos, de fondo plano que contenía 25 ul de MEM. Luego se adicionaron 50 ul de una suspensión de células en una concentración de 200.000 células por ml de MEM adicionado de un 16% de suero bovino. La microplaca se incubó a 37° C por 72 horas, en un ambiente con un 5% de CO₂, haciéndose observaciones microscópicas diarias para registrar los pocillos con efecto citopático (Schmidt, 1964). La presencia del virus se evidenció por el típico efecto citopático de los herpesvirus, de englobamiento y lisis celular, el que se observó a partir de las 24 horas de incubación y aumentó progresivamente en el tiempo hasta alrededor de las 72 horas. El título del virus se calculó por el método de Reed y Muench (1938), y corresponde a la dilución viral que produce efecto citopático en el 50 % de la población de pocillos celulares y representa 1 DICT 50.

Técnica de Seroneutralización Dilución Punto Final (SNDPF)

La prueba SNDPF se realizó en microplacas -(CELLSTAR ®) de 96 pocillos, de fondo plano- haciéndose diluciones al doble de los sueros en prueba. Las diluciones comprendieron el rango de 1:2 a 1:64 en MEM en volumen de 25 ul. Cada dilución de suero (en duplicado) se enfrentó a 100 DICT50 de VHE-1 contenidas en 25 ul de MEM. Después de incubar la mezcla suero-virus a 37°C por una hora se adicionaron 50 ul de una suspensión de células en concentración de 200.000 células por ml de MEM con un 15% de suero fetal bovino (Schmidt, 1964).

La microplaca, una vez sellada con Parafilm ® se incubó por 3 días a 37° C en un ambiente con un 5 % de CO₂. Paralelamente a la ejecución de la prueba, se realizaron controles del título viral, de las dosis virales empleadas, de la citotoxicidad de los sueros problema, de la viabilidad celular y se titularon sueros de referencia, uno desprovisto de anticuerpos para el VHE-1 y uno con un título conocido de anticuerpos para el VHE-1, a modo de control negativo y positivo, respectivamente. (Schmidt, 1964).

Se realizaron observaciones diarias de las monocapas celulares en los pocillos, registrando aquellos que presentaban efecto citopático.

Todos los sueros que presentaron capacidad de neutralizar al virus, fueron re-evaluados, a modo de confirmar resultados y definir el título final de neutralización, haciéndose diluciones en base dos desde 1:2 a 1:512.

Análisis de resultados

Los resultados se presentaron mediante distribuciones de frecuencias y los títulos promedios de los animales positivos se analizaron mediante análisis de varianza y comparaciones múltiples de Sheffé (Guenther, 1964).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 204 muestras de CS analizadas, 52 (25,5 %) presentaron anticuerpos neutralizantes para el VHE-1, valor que podría ser más alto, ya que en ocasiones puede no detectarse anticuerpos después de una infección primaria (Murphy *et al.*, 1999).

Con este resultado se puede asumir que el 25,5% de los CS estudiados han hecho infección con el VHE-1 o el VHE-4 (antigénicamente relacionado), o ambos. También se da la posibilidad que estén infectados con otro virus herpes que comparte antígenos neutralizables con el VHE-1, como el herpes virus asinino 3 (HVA-3), aislado de asnos (Ficorilli *et al.*, 1995) o el virus herpes equino 9 (VHE-9), aislado de gacelas Thomson (*Gazella thomsoni*) (Fukushi *et al.*, 1997), a pesar de que la infección por estos virus no ha sido detectada en el país. Es importante el considerar la posibilidad de que estos resultados nos permitan evidenciar la presencia de un virus herpes propio de los CS y antigénicamente relacionado al VHE-1.

Para la población equina se dispone de un ELISA comercial tipo específico, que permite diferenciar anticuerpos para VHE-1 y VHE-4 (Crabb *et al.*, 1995), pero técnicamente este ELISA no es aplicable a los CS ya que se encuentran diseñados específicamente para anticuerpos de origen equino.

Los antecedentes existentes en relación a infecciones naturales en equinos, se han realizado con la técnica de ELISA tipo específico, encontrándose valores de 25 a 30% de animales con anticuerpos para el VHE-1 (Crabb *et al.*, 1995; Gilkerson *et al.*, 1998; Gilkerson *et al.*, 1999; Foote *et al.*, 2003); si bien los resultados obtenidos por dicha técnica no son del todo comparables con los obtenidos a través de la SN, estos valores son concordantes a los pesquisados en este estudio, lo que podría dar señales de un comportamiento similar de la difusión del virus en los CS a como ocurre en los equinos.

Se debe considerar que los anticuerpos neutralizantes, pueden estar dirigidos a los epitopes neutralizables comunes de los VHE-1, VHE-4, VHA-3 o VHE-9 y los estudios que tienen a diferenciar al VHE-1 del VHE-4 empleando la prueba de seroneutralización

(Thompson *et al.*, 1976; Burrows *et al.*, 1984; Fitzpatrick y Studdert, 1984; Mumford y Bates, 1984; Edington et al, 1985), entregan resultados contradictorios, haciendo imposible una interpretación razonable, de tal modo que para conocer que tipo de virus herpes está infectando a la población de CS, es necesario obtener un aislado viral y hacer los estudios correspondientes para su identificación empleando anticuerpos monoclonales o por el análisis electroforético de su genoma sometido a tratamiento con diferentes enzimas de restricción (Allen y Bryans 1986).

Considerando la cantidad de animales, por cada especie, que presentaron anticuerpos para el VHE-1, de las 98 alpacas, 19 (19,4 %) fueron positivas; de las 44 llamas, 10 (22,7 %) fueron positivas; de los 37 guanacos, 9 (24,3 %) fueron positivos; y de las 25 vicuñas, 14 (56 %) fueron positivos; con títulos promedios de los animales que presentaron anticuerpos entre 6,1 y 17(Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2.

Muestras positivas a anticuerpos Seroneutralizantes por especie de Camélidos Sudamericanos para Virus Herpes Equino 1 y Títulos Promedios de los sueros positivos

<u>Camélidos Sud-americanos</u>	<u>N° de muestras</u>	<u>Positivas</u>		<u>Título promedio</u> ^o	<u>Título Min - max</u> ^o
		N°	%		
Alpaca	98	19	19,4	6,1	2,8 - 45
Llama	44	10	22,7	12,0	2,8 - 180
Guanaco	37	9	24,3	12,0	4,0 - 16
Vicuña	25	14	56,0	17,0	4,0 - 89
Total	204	52	25,5	10,0	2,8 - 89

^o Título expresado como el recíproco de la dilución de suero que neutraliza al 50% de 100 DICT50

Los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos por la prueba DPFSN, oscilaron entre 2,8 y 180 con distribución de frecuencias relativamente similares (Cuadro N° 3), siendo el promedio de los sueros positivos de 10. El promedio de los sueros positivos para las alpacas fue 6,1; para las llamas 12; para los guanacos 12 y para las vicuñas 17, detectándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el promedio de vicuñas con alpacas, no detectándose otras diferencias entre los promedios (Cuadro N° 2).

En comparación con la respuesta inmune generada por anticuerpos neutralizantes para el VHE-1 en la población equina, en este estudio se encontraron algunos valores más altos que los encontrados en equinos del país, producto de infecciones naturales por VHE-1 y/o VHE-4 y por vacunación con VHE-1 (Berríos y Celedón, 1992), pero están en el rango de títulos detectados en equinos de otras latitudes, producto de infecciones naturales (Thomson *et al.*, 1979; Bryans, 1980; Sugiura *et al.*, 1997; Ruitenber *et al.*, 2000), y producto de vacunaciones (Dutta y Shipley, 1975; Purdy *et al.*, 1978; Bryans, 1980; Crandell *et al.*, 1980; Ruitenber *et al.*, 2000; Fitzpatrick y Studdert, 1984; Patel *et al.*, 2003)

Cuadro N° 3.

Distribución de frecuencia de Títulos de Anticuerpos Seroneutralizantes por especie de Camélidos Sudamericanos para el Virus Herpes Equino 1

Título ^o	Alpacas	Llamas	Guanacos	Vicuñas	Total
<2 ^o	79	34	28	11	152
2,8	2	1	0	0	3
4,0	8	3	2	2	15
5,6	3	0	0	1	4
8,0	1	2	0	0	3
11,0	3	0	3	4	10
16,0	0	1	4	2	7
23,0	1	0	0	0	1
45,0	1	2	0	4	7
89,0	0	0	0	1	1
180,0	0	1	0	0	1
Total	98	44	37	25	204

^o Título expresado como el recíproco de la dilución de suero que neutraliza al 50% de 100 DICT50

^{oo} Muestras de suero diluidas al doble y que no neutralizan el virus fueron registradas como negativas

Suponiendo que la respuesta inmune de los CS es similar a la de los equinos, donde se alcanzan títulos máximos aproximadamente a las 3 semanas después de la infección, manteniéndose durante 4 a 5 meses y luego disminuyen hasta desaparecer entre los 6 y 12 meses, en ausencia de reactivación del virus en latencia (Allen y Bryans, 1986); los

antecedentes antes señalados indicarían que estos animales presentaron infecciones recientes con el virus ; o bien podría tratarse de una respuesta inmune diferente. Al respecto, cabe considerar que cuando en Nueva York alpacas chilenas fueron afectadas con ceguera y encefalitis asociada con infección con un virus herpes indistinguible de VHE-1, muestras pareadas de suero indicaron títulos contra VHE-1 que ascendieron de 4 a 192 (Rebhun *et al.*, 1988), valores que están en el rango detectado en este estudio.

Es preciso señalar que el empleo de una cepa homóloga al virus actuante permitiría conocer con mayor precisión los niveles de anticuerpos en los CS, en consideración a que además de haber diferencias antigénicas entre los diferentes tipos de virus herpes equinos (Fitzpatrick y Studdert, 1984), también se ha detectado variabilidad antigénica entre aislados de un mismo tipo, especialmente para el VHE-1 (Thomson *et al.*, 1976; Turtinen *et al.*, 1981; Celedón *et al.*, 1992).

La detección de un mayor número de reaccionantes, con los mayores títulos de anticuerpos, en las especies silvestres (vicuñas y guanacos) que se encontraban en sus ambientes naturales, en relación con las especies domésticas (alpacas y llamas) que se encontraban en cautiverio en contacto con el ganado doméstico, llevaría a apoyar la sospecha de que la seropositividad sería atribuible mas bien a infecciones con un virus de la especie o a traspaso del virus desde otras especies desde tiempos pasados, manteniéndose el virus en la población de CS por generaciones, más que a un traspaso del virus desde la población equina en tiempos recientes. Esto es diferente a lo detectado en las mismas muestras de suero, en referencia a la infección con pestivirus, donde se detectó que sólo las especies domésticas, alpacas y llamas, tuvieron anticuerpos para el virus de la diarrea viral bovina (Celedón *et al.*, 2001).

En cuanto a la distribución geográfica de los CS que presentan anticuerpos para el VHE-1, se pudo detectar en alpacas y llamas de 3 rebaños de la Región Metropolitana, en vicuñas del altiplano de la I Región y en guanacos de la IV y XII Regiones, observándose una amplia distribución en el territorio nacional, a pesar del escaso número de muestras analizadas.

Con estos resultados no es posible atribuir un rol patógeno al virus que está infectando a los CS, ya que en la mayoría de los casos los sueros fueron obtenidos de animales sin registros clínicos de haber sufrido enfermedades, a excepción de 4 llamas seropositivas procedentes de un predio donde se presentó muerte súbita en un rebaño de 45 hembras con una mortalidad cercana al 20% y sólo se observó, previo a los decesos, hipertermia así como lesiones muy hemorrágicas en el intestino de los ejemplares muertos. Cabe destacar que de algunos animales de dicho rebaño se aisló un pestivirus, haciéndose con estos datos imposible el conocimiento del agente causal de dicha manifestación clínica.

Finalmente, frente a los antecedentes que: 1) CS de diferentes regiones del país se han infectado con un virus que comparte antígenos comunes con el VHE-1; 2) en Estados Unidos un virus similar al VHE-1 ha provocado manifestaciones clínicas graves, que ha llevado a la muerte de CS; 3) el VHE-1 y virus herpes antigénicamente relacionados con él, son patógenos importantes para la población equina; 4) alpacas y llamas del altiplano chileno tienen una alta mortalidad en las crías y baja natalidad relacionada con un alto porcentaje de abortos, y signología de enfermedad respiratoria, con desconocimiento del agente causal y posiblemente atribuible a virus herpes; 5) el desconocimiento del rol patógeno de este virus para los CS y la posibilidad de servir estos como reservorio y por lo tanto fuente de infección para otras especies silvestres y/o domésticas, permiten presumir la importancia de proseguir con la búsqueda, identificación y conocimiento del rol patógeno de este agente, por las implicancias socioeconómicas que una infección con manifestación clínica puede presentar, especialmente, para las comunidades que hacen uso del recurso de CS.

CONCLUSIÓN

Los CS del país: alpacas, llamas, guanacos y vicuñas poseen anticuerpos que neutralizan la capacidad infectante del VHE-1, lo que lleva a concluir que en Chile los camélidos sudamericanos están infectados con un virus que comparte antígenos comunes con el VHE-1.

1. Los CS de Chile poseen anticuerpos neutralizantes contra el VHE-1.
2. En Chile, los CS están infectados con VHE-1 o un virus que comparte antígenos comunes con el VHE-1.
3. Los títulos de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1 encontrados en los CS en Chile, fueron similares a los niveles de anticuerpos neutralizantes encontrados en equinos en otras regiones del mundo.
4. La detección de un mayor número de animales infectados en las especies silvestres (guanacos y vicuñas) que en las especies domésticas (alpacas y llamas), lleva a pensar en una infección endémica en la población de CS, más que producto de la infección directa desde la población equina.

BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, G.P.; BRYANS, J.T. 1986. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. In: Pandey, R. (Ed.), Progress in Veterinary Microbiology and Immunology, vol. 2, S. Karger, Basel, pp 78-144.
- ARCE, C. 2001. Infección por pestivirus en un rebaño de alpacas de la zona central de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 42 p.
- BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; LARSEN, R.S.; Y OTROS POR BUSCAR. 2000. Bovine viral diarrhoea in New World camelids. J. Vet. Diagn. Invest. 15:568-570.
- BERRÍOS, P.; CELEDÓN, M. 1992. Rinoneumonitis Equina en Chile (1969-1992). Avances en Ciencias Veterinarias. 7: 137-153.
- BRYANS, J.T. 1980. Serologic responses of pregnant thoroughbred mares to vaccination with an inactivated equine herpesvirus 1 vaccine. Am. J. Vet. Res. 41:1743-1746.
- BURROWS, R.; GOODRIDGE, D.; DENYER, M.S. 1984. Trials of an inactivated equid herpesvirus 1 vaccine: challenge with a subtype 1 virus. Vet. Rec. 114:369-374.
- CAMPBELL, T.M.; STUDERT, M.J. 1983. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1). Vet. Bull. 53: 135-146.
- CELEDÓN, M.; SANDOVAL, A.; DROGUETT, J.; CALFÍO, 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.; OSORIO, J.; PIZARRO, J.; NAVARRO, C. 2000. Pesquisa de Pestivirus en camélidos sudamericanos: alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*) y guanacos (*Lama guanicoe*). In: XI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. Santiago, Chile. 25-27 octubre 2000.
- CELEDÓN, M.; PALACIOS, L.; PIZARRO, J.; IBARRA, L. 1997. Prevalencia de anticuerpos seroneutralizantes para el virus de la diarrea viral bovina en ganado de carne de la Región Metropolitana de Chile. Av. Cs. Vet. 12:98-100.

- CELEDÓN, M.; VARGAS, C.; SALINAS, A.; CASANOVA, A.; IBARRA, L.; BERRÍOS, P. 1996. Prevalencias serológicas para el virus de la diarrea viral bovina y de la rinotraqueítis infecciosa bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. *Av. Cs. Vet.* 11:75-80.
- CELEDÓN, M.; BERRÍOS, P.; IBARRA, L. 1992. Estudio antigénico de cepas chilenas de virus herpes equino tipo 1. *Arch. Med. Vet.* 24:149-155.
- CRABB, B.S.; MACPHERSON, C.M.; REUBEL, G.H.; BROWNING, G.F.; STUDDERT, M.J.; DRUMMER, H.E. 1995. A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesvirus 4 and 1. *Arch. Virol.* 140:245-258.
- CRANDELL, R.A.; MOCK, R.E.; LOCK, T.F. 1980. Vaccination of pregnant ponies against equine rhinopneumonitis. *Am. J. Vet. Res.* 41:994-996.
- DIMOCK, W.W.; EDWARDS, P.R. 1933. Is there a filtrable virus of abortion in mares?. *Kentucky Agr. Exp. Sta. Bull. Suppl.* 333:297-301. (citado por Kaji, T. 1963. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 3:11-20.
- DOLL, E.R.; WALLACE, M.E.; RICHARD, M.G. 1954. Termal, hematological and serological responses of weanling horses following inoculation with equine abortion virus: its similarity to equine influenza. *Cornell Vet.* 44:181-190. (citado por Kaji, T. 1963. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 3:11-20.
- DOLL, E.R.; BRYANS, J.T. 1962. Incubation periods for abortion in equine viral rhinopneumonitis. *J. Am. Vet. Assoc.* 141:351. Citado por Allen, G.P.; Bryans, J.T. 1986. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. In: Pandey, R. (Ed.), *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*, vol. 2, S. Karger, Basel, pp 78-144.
- DOYLE, LG.; HEUSCHELE, W.P. 1983. Bovine virus diarrhea virus infection in captive exotic ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183:1257-1259.
- DUTTA, S.K.; SHIPLEY, W.D. 1975. Immunity and the level of neutralization antibodies in foals and mares vaccinated with a modified live-virus rhinopneumonitis vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 36:445- 448.
- EDINGTON, N.; BRIDGES, C.G.; HUCKLE, A. 1985. Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) following the administration of corticosteroids. *Equine Vet. J.* 17:369-372.
- EVERMANN, J.F.; BERRY, E.S.; BASZLER, T.V. 1993. Diagnostic approaches for the detection of bovine viral diarrhea (BVD) virus and related pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 265-269.

- FERNANDEZ-BACA, S. 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de camélidos sudamericanos .FAO. Oficina Regional de Producción Animal. Santiago de Chile. 429 pp.
- FIA (FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA). 2000. Camélidos en Chile situación actual y perspectivas. Gobierno de Chile. 130pp.
- FICORILLI, N.; STUDDERT, M.J.; CRABB, B. S. 1995. The nucleotide sequence of asinine herpesvirus 3 glycoprotein G indicates that the donkey virus is closely related to equine herpesvirus 1. *Arch. Virol.* 40:1653-1662.
- FITZPATRICK, D.R.; STUDDERT, M.J. 1984. Immunologic relationships between equine herpesvirus type 1 (equine abortion virus) and type 4 (equine rhinopneumonitis virus). *Am. J. Vet. Res.* 45:1947-1952.
- FOOTE, C.E.; GILKERSON, J.R.; WHALLEY, J.M.; LOVE, D.N. 2003. Seroprevalence of equine herpesvirus 1 in mares and foals on a large Hunter Valley stud farm in years pre and postvaccination. *Aust. Vet. J.* 81:283-288.
- FOWLER, M. 1989. Infectious Diseases. *Medicine and Surgery of South American Camelids*. 5th Ed. Ames, Iowa State University Press. pp 105-107. (citado por Mattson, D.E. 1994. Viral diseases. Update on llamas medicine. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 10:345-351.
- FUKUSHI, H.; TOMITA, T.; TANIGUCHI, A.; OCHIAI, Y.; KIRISAWA, R.; MATSUMURA, T., YANAI, T., MASEGI, T., YAMAGUCHI, T., HIRAI, K. 1997. Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. *Virology.* 227:34-44.
- GALBREATH, E.J.; HOLLAND, R.E.; TRAPP, A.L.; BAKER-BELKNAP, E.; MAES, R.K.; YAMINI, B.; KENNEDY, F.A.; GILARDY A.K.; TAYLOR, D. 1994. Adenovirus-associated pneumonia and hepatitis in four llamas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:424-426.
- GILKERSON, J.; LOVE, D.; DRUMMER, H.; STUDDERT, M.; WHALLEY, J. 1998. Seroprevalence of equine herpesvirus 1 in Thoroughbred foals before and after weaning. *Aust. Vet. J.* 76:677-682.
- GILKERSON, J.R.; WHALLEY, J.M.; DRUMMER, H.E.; STUDDERT, M.J.; LOVE, D.N. 1999. Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV-1 for unweaned foals. *Vet. Microbiol.* 68:27-34.

- GOMEZ, D. 1964. Ensayos sobre susceptibilidad de los Auguenidos a la ectomatitis vesicular. In Anales II Cong Nac Med Vet y Zoot, Lima, Perú. 403-406 pp. (citado por Mattson, D.E. 1994. Viral diseases. Update on llamas medicine. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 10:345-351.
- GUENTHER, W. 1964. Analysis of variance. Prentice-Hall. London. U.K.
- HARTLEY, W.J.; DIXON, R.J. 1979. An outbreak of foal perinatal mortality due to equid herpesvirus type 1: Pathological observations in New Zealand. N.Z. vet. J. 29:7-8. (Citado por Allen, G.P.; Bryans, J.T. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. In: Pandey, R. (Ed.), Progress in Veterinary Microbiology and Immunology, vol. 2, S. Karger, Basel, pp 78-144.
- HOUSE, J.A.; GREGG, D.A.; LUBROTH, J.; DUBOVI, E.J.; TORRES, A. 1991. Experimental equine herpesvirus-1 infection in llamas (*Lama glama*). J. Vet. Diagn. Invest. 3:137-143.
- HUTCHISON, J.M.; GARRY, F.B.; JOHNSON, L.W.; QUACKENBUSH, S.L.; GETZY, D.M.; JENSEN, W. A.; HOOVER, E.A. 1992. Immunodeficiency Syndrome associated with wasting and opportunistic infection in juvenile llamas: 12 cases (1988-1990). J. of American Vet. Med. Assoc. 201:1070-1076.
- INE (INSTITUTO NACIONAL ESTADISTICAS). 1997. VI Censo Agropecuario. Resultados Preliminares. Edición José Cayuela. Stgo. Chile, INE, 443 p.
- JENKINS, D. 1985. Alpacas and llamas are susceptible to an equine disease. Llama Magazine. Nov / Dec:15-16. (citado por Mattson, D.E. 1994. Viral diseases. Update on llamas medicine. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 10:345-351.
- LOKEN, T. 1995. Ruminant pestivirus infections in other animals. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11:597-614.
- MANCINI, H. 1952. Ensayos sobre la Receptividad de los Auguenidas a la Fiebre Aftosa. Bol Inst Nac Antiaftoso, Lima , Perú. 1:127-145. (citado por Mattson, D.E. 1994. Viral diseases. Update on llamas medicine. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 10:345-351.
- MATTSON, D.E. 1994. Viral diseases. Update on llamas medicine. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 10:345-351.
- MCBEATH, D.G.; WELLS, W.P.; EYRE, P.; HANNA, C.J. 1983. Equine immunology 4: Vaccines and antisera. Equine Vet. J. 15:196-200.

- MORO, M. 1971a. Fiebre aftosa en Alpaca. En: La Alpaca. Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. Unva Nac. San Marcos, Lima , Perú. 8:34. (citado por Mattson, D.E. 1994. Viral diseases. Update on llamas medicine. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 10:345-351.
- MORO, M. 1971b. Ectima. En: La Alpaca. Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. Unva Nac San Marcos, Lima , Perú. 8:34. (citado por Mattson, D.E. 1994. Viral diseases. Update on llamas medicine. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 10:345-351.
- MOTHA, M.X.J.; THAM, K-M. 1992. Pestivirus infections in a llama (*Lama glama*). N. Z. Vet. J. 40:126.
- MÜLLER, C. 2003. Aislamiento e identificación de pestivirus y herpesvirus obtenidos de ovinos y caprinos de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 77 p.
- MUMFORD, J.A.; BATES, J. 1984. Trials of an equid herpesvirus 1 vaccine: challenge with a subtype 2 virus. Vet. Rec. 114:375-381.
- MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. 1999. Veterinary Virology. 3rd. Academic Press. New York. USA. 629p.
- MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. 1995. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag Wien New York. USA. 586p.
- PARREÑO, V.; COSTANTINI, V.; CHEETHAM, S.; BLANCO VIERA, J.; SAIF, L.J.; FERNÁNDEZ, F.; LEONI, L.; SCHUDEL, A. 2001. First isolation of rotavirus associated with neonatal diarrhoea in guanacos (*Lama guanicoe*) in the Argentinean Patagonia Region. J. Vet. Med. B. 48:713-720.
- PATEL, J.R.; BATEMAN, H.; WILLIAMS, J.; DIDLICK, S. 2003. Derivation and characterisation of a live equid herpes virus-1 (EHV-1) vaccine to protect against abortion and respiratory disease due to EHV-1. Vet. Microbiol. 91:23-39.
- PERL, S.; HAINES, D.; YAKOBSON, B.; SAMINA, I.; SHEIN, M.; SHEICHAT, N.; AVNI, G. 1997. Paresis in horses associated with equine herpes virus 1 infection. Isr. J. Vet. Med. 52:132-136.

- PICTON, R. 1993. Serologic survey of llamas in Oregon for antibodies to viral diseases of livestock (MS thesis). Corvallis, Oregon State University. Citado por Mattson, D.E. 1994. Viral diseases. Update on llamas medicine. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 10:345-351.
- PURDY, C.W.; FORD, S.J.; PORTER, R.C. 1978. Equine rhinopneumonitis vaccine: immunogenicity and safety in adult horses, including pregnant mares. Am. J. Vet. Res. 39:377-383.
- RAMÍREZ, A. 1971. Ectima Contagioso en Alpaca. En: La Alpaca. Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. Unva Nac San Marcos, Lima, Perú. 8:34. (citado por Mattson, D.E. 1994. Viral diseases. Update on llamas medicine. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 10:345-351)
- REBHUN, W.C.; JENKINS, D.H.; RIIS, R.C.; DILL, S. G.; DUBOVI, E.J.; TORRES, A. 1988. An epizootic of blindness and encephalitis associated with Herpesvirus indistinguishable from equine herpesvirus 1 in a herd of alpacas and llamas J. Am. Vet. Med. Assoc. 192:953-956.
- REED, L.J.; MUENCH, H. 1938. A simple method of estimating fifty-percent endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497.
- REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S.; ERNST, S.; AGUILAR, M.; ENRIQUEZ, M.; GALLARDO, J. 1990. Seroprevalence of bovine viral diarrhea/mucosal disease in Southern Chile. Prev. Vet. Med. 10:73-78.
- RIVERA, H.; MADEWELL, B.R.; AMEGHINO, E. 1987. Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama pacos*). Am. J. Vet. Res. 48:189-191.
- RUITENBERG, K.M.; LOVE, D.N.; GILKERSON, J.R.; WELLINGTON, J.E.; WHALLEY, J.M. 2000. Equine herpesvirus 1 (EHV-1) glycoprotein D DNA inoculation in horses with pre-existing EHV-1/EHV-4 antibody. Vet. Microbiol. 76: 117-127.
- SAXEGAARD, F. 1966. Isolation and identification of equine pneumonitis virus (equine abortion virus) from cases of abortion and paralysis. Nordisk Veterinaermedicin. 18:504-516. (citado por Perl, S.; Haines, D.; Yakobson, B.; Samina, I.; Shein, M.; Sheichat, N.; Avni, G. 1997. Paresis in horses associated with equine herpes virus 1 infection. Isr. J. Vet. Med. 52:132-136.
- SCHMIDT, N.J. 1964. Tissue culture methods and procedures for diagnostic virology. In Lennette E.H; Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases. 3rd ed. Broadway, New York.:78-176 .

- STIERSTORFER, B.; EICHHORN, W.; SCHMAHL, W.; BRANDMÜLLER, C.; KAADEN, O.R.; NEUBAUER, A. 2002. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) myeloencephalopathy: a case report. *J. Vet. Med. B.* 49:37-41.
- SUGIURA, T.; KONDO, T.; MATSUMURA, T.; IMAGAWA, H.; KAMADA, M.; IHARA, T. 1997. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for titration of antibody to equine herpesvirus type 1. *J. Equine Sci.* 8:57-61.
- SHANNON, J.E. 1972. American Type Culture Collection; Registry of animal cell lines. 2nd ed. Rockville, Maryland. CCL22.
- THEDFORD, T.R.; JHONSON, L.W. 1989. Infectious diseases of new-world camelids (NWC). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 5:145-156.
- THOMSON, G.R.; MUMFORD, J.A.; SMITH, I.M. 1979. Experimental immunization against respiratory disease due to equid herpesvirus 1 infection (rhinopneumonitis) using formalin-inactivated virus with various adjuvants. *Vet. Microbiol.* 4:209-222.
- THOMSON, G. R.; MUMFORD, J.A.; CAMPBELL, J.; GRIFFITHS, L.; CLAPHAM, M.P. 1976. Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet. J.* 8:58-65.
- THRUSFIELD, M. 1986. *Veterinary Epidemiology*. Butterworths, London. 280 p.
- TURTINEN, L.W.; ALLEN, G.P.; DARLINGTON, R.W.; BRYANS, J.T. 1981. Serologic and molecular comparisons of several equine herpesvirus type 1 strains. *Am. J. Vet. Res.* 42:2099-2104.
- UNDERWOOD, W.J.; MORIN, D.E.; MIRSKY, M.L.; HASCHEK, W.M.; ZUCKERMANN, F.A.; PETERSEN, G.C.; SCHERBA, G. 1992. Apparent Retrovirus -induced immunosuppression in a yearling llama. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200:358-362.
- WENTZ, P.A.; BELKNAP, E.B.; BROCK, K.V.; COLLINS, J.K.; PUGH, D.G. 2003. Evaluation of bovine viral diarrhea virus in New World camelids. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223:223-228.

- WESTERFIELD, C.; DIMOCK, W.W. 1946. The pathology of equine virus abortion. J. Am. Vet. Med. Assoc. 59:101-111. (Citado por Allen, G.P.; Bryans, J.T. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. In: Pandey, R. (Ed.), Progress in Veterinary Microbiology and Immunology, vol. 2, S. Karger, Basel, pp 78-144.

- YAEGER, M. 2002. PRO/AH/EDR West Nile virus, alpaca – USA (Iowa). [en línea] International Society for Infectious Diseases. 20020917 <<http://www.promedmail.org>> [consulta: 23-09-02]