



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS
MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL
VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN
VACUNAS DE USO VETERINARIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

NINNET EVELYN GÓMEZ ROMERO

ASESORES:

DR. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA
DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

Marzo 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Con amor y gratitud:

A mi madre Grace Romero Vértiz, por ser la amiga que me ha ayudado a crecer. Con tu amor y la calidez de tus abrazos he aprendido de la vida que cada día es una enseñanza y que puedo llegar tan lejos como me lo proponga. Gracias por que siempre me has alentando a convertir mis metas y sueños en realidad; y con tu apoyo incondicional lo he logrado y me has guiado al éxito. Te agradezco profundamente por estar a mi lado en los momentos de adversidad y tristeza; por enseñarme lo que es el amor, por tu tiempo y paciencia. Eres una mujer admirable!

A mi padre Francisco Gómez Franco, me has enseñado con ternura el valor de pertenecer a una familia. Te doy las gracias por instruirme para saber como quitar las piedras del camino y demostrarme cuando es tiempo de cosechar frutos. De ti aprendí a defender mis ideales y que rendirme nunca es una opción. Es el ánimo que siempre me das, el motivo para ser una mejor persona.

Dios me ha bendecido al tenerlos como padres. Han sido un ejemplo de amor, valentía, trabajo, inteligencia y fortaleza; su vida ha sido mi inspiración para recorrer este camino que se llama vida. Mejores padres no puedo tener.

A mis hermanas Shanty y Mimi, que son las mejores compañeras de vida que puedo tener; gracias a ustedes disfrute una de las mejores etapas de mi vida: la infancia. Hicimos tantas travesuras juntas, que gracias a eso nos sobran historias para contar. Agradezco que sean mis confidentes, cómplices y aliadas en todos mis proyectos; pero sobre todo que en los momentos de dificultad conté con su amor y me ayudaron a superar la tristeza. Siempre me cuidaron y protegieron, buscaron lo mejor para mí; y por eso viviré agradecida eternamente con ustedes, por compartir su vida conmigo y alegrar la mía; porque me hacen sentir la persona más querida y porque gracias a ustedes nunca estuve sola. Las amo.

A mi prima Montse, que desde niñas nos vio como hermanas y compartimos muchas cosas juntas. Eres símbolo de nobleza. Gracias por tantas risas!

A Azu, Andy y Domy gracias por quererme, apoyarme y por consentirme siempre.

A mis amigos Mariana Reyes, Natalia Castro, Ernesto Sarabia, Fernanda Carrasco, Edmundo Belderrain, Luis Iván Del Real, José Miguel Benítez por ser parte importante de mi vida .Gracias por su apoyo y cariño, por tener disponibles

sus oídos y su hombros para mi, por las largas pláticas, por la motivación, la confianza, por tantas risas, por su sinceridad, por sus consejos. Los amigos duplican las alegrías y dividen las tristezas.

A mis amigos del Departamento de Microbiología e Inmunología; Isa, Clau, Mony, Victor, Julio, Aideé, Diana, Mónica, Lázaro, Luz, Martita, Vero, Faby, Marlenne, Cuauh, Ulises ustedes forman parte de este proceso que esta por concluir. Les agradezco su amistad, por compartir esos días de frustración pero también por esos días de alegría y diversión. Valoro profundamente su ayuda y comprensión. Formamos un gran equipo y de cada uno aprendí mucho.

A mis amigos con los que curse la licenciatura Rafa, Damián, Pamela, Gaby, Jaqueline por que recorrer este camino conmigo.

A la Dra. Rosa Elena Miranda Morales por darme la oportunidad de estar en el laboratorio de Micoplasmas, por su confianza y apoyo.

A la Dra. Carolina Segundo Zaragoza por las pláticas de aliento y tu valiosa amistad.

Siempre han estado a mi lado alentándome a consolidar cada una de mis metas. Ustedes son los que le han dado vida a mis proyectos y han compartido conmigo los momentos más importantes de mi vida. Es gracias a su amor, comprensión, apoyo y confianza que he podido realizar éste trabajo. Ustedes son mi fuerza e impulso indispensables para seguir adelante. ¡Gracias! Soy la persona más afortunada por contar incondicionalmente con su cariño.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el proyecto: IN-228710 “Implementación de técnicas moleculares como una alternativa de evaluación de la identidad y pureza de vacunas e inmunógenos”.

A mis asesores:

Dr. Francisco Basurto Alcántara, por creer siempre en mí. La oportunidad que me brindó al trabajar en el laboratorio de Vacunología y Constatación fortaleció mi formación como profesionista. En usted encontré la motivación para ser cada día la mejor en cualquier aspecto. Siempre recibí, en los momentos de dificultad, las palabras necesarias que me ayudaron a no detenerme hasta lograr mi objetivo. Porque encontré en usted un amigo.

Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, por su asesoramiento y apoyo continuo en el presente trabajo. Por sus consejos y enseñanzas, por fomentar en mí y en nuestro equipo de trabajo la responsabilidad pero sobre todo la disciplina. Agradezco su invitación para formar parte de los seminarios de Microbiología Molecular con los cuales pude reforzar y evaluar de manera constante mis conocimientos.

Son ustedes por quienes siento admiración y respeto ¡Gracias!

A los miembros del honorable jurado por sus amables y acertadas correcciones.

Presidente: Dra. Laura Patricia Noé Martínez
Vocal: Dra. Laura Cobos Marín
Secretario: Dr. Rogelio Alonso Morales
Suplente: Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara
Suplente: Dr. Alfredo Castañeda Ramírez

Al MVZ José Manuel Saavedra Montañez por instruirme en el manejo de cultivos celulares, por tu paciencia y por estar siempre dispuesto a ayudarme.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento por la donación de la cepa NADL para utilizarla como control positivo en este trabajo.

A la Dra. Laura Patricia Noé Martínez por darme la posibilidad de trabajar y dar clases en sus grupos, por sus valiosos aportes; por su ayuda, sugerencias y

disposición para corregir la redacción de esta tesis. Por todo el apoyo que me dio durante mi formación.

Al Dr. Alfredo Castañeda Ramírez le agradezco su disposición y paciencia para ayudarme a esclarecer dudas en cualquier momento.

Al M en C, MVZ Lauro Velázquez Salinas por la asesoría en la realización de los alineamientos y los análisis filogenéticos, por brindarme tu apoyo en este proceso. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo, por tus consejos y anécdotas. Por poseer el don de la enseñanza y la paciencia.

Al MVZ Francisco José Liljehult Fuentes por sus aportaciones al presente trabajo.

Al MVZ Ángel Retana porque cada una de sus experiencias y relatos me dejó siempre una enseñanza, gracias por sus importantes aportaciones a este proyecto.

Tec. Raúl Hernández Aragón por tu apoyo en la preparación de materiales y reactivos, por estar al pendiente de lo que necesitaba y sobre todo por tu amistad.

A todo el personal académico, administrativo y amigos del departamento de Microbiología e Inmunología que de manera directa o indirecta contribuyeron a la realización de este trabajo.

ÍNDICE

Unidad	Tema	Página
	Resumen	1
	Abstract	3
1.	Introducción	4
1.1	Generalidades	4
1.2	Características del vDVB	5
1.2.1	Genotipos	6
1.2.2	Biotipos	8
1.2.3	Replicación viral	10
1.3	Patogenia	12
1.3.1	Diarrea viral bovina	14
1.3.2	Enfermedad de las mucosas	17
1.4	Contaminación por el vDVB	18
2.	Justificación	21
3.	Hipótesis	22
4.	Objetivos	23
4.1	Objetivo general	23
4.2	Objetivos específicos	23
5.	Material y Métodos	25
5.1	Cepa del vDVB	25
5.2	Muestras de trabajo	26
5.2.1	Extracción de ARN	27
5.3	Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	28
5.3.1	Aplicación de la técnica de RT-PCR en muestras de trabajo	30

5.4	Secuenciación y análisis del ADN	30
6.	Resultados	33
6.1	Determinación de la identidad de las cepas testigo	33
6.2	Amplificación del fragmento de la región 5`UTR	34
6.2.1	Análisis filogenético del fragmento de la región 5`UTR	38
7.	Discusión	41
8.	Conclusiones	48
9.	Prospectiva	48
	Anexo 1	50
	Anexo 2	52
	Referencias	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1.1	Clasificación del vDVB	7
Figura 1.2	Análisis microscópico de células MBDK	9
Figura 1.3	Organización del genoma del vDVB	9
Figura 1.4	Replicación viral	12
Figura 1.5	Interpretación de las presentaciones clínicas causadas por la infección con el vDVB	18
Figura 5.1	Condiciones de la temperatura y ciclos en la PCR para 5'UTR establecidas en el termociclador.	29
Figura 6.1	Producto de la RT-PCR (Cepa referencia vDVB NADL)	33
Figura 6.2.	Producto de la RT-PCR para 5'UTR (vacunas).	34
Figura 6.3.	Producto de la RT-PCR para 5'UTR (SFB)	35
Figura 6.4	Producto de la RT-PCR para 5'UTR (líneas celulares).	36
Figura 6.5	Producto de la RT-PCR para 5'UTR (vacunas)	37
Figura 6.6	Análisis filogenético y clasificación del vDVB basados en un fragmento de 293pb de la región 5'UTR	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
Cuadro 1.1	Familia <i>Falvivirus</i>	6
Cuadro 1.2	Mecanismos genéticos descritos para la expresión de NS3	10
Cuadro 1.3	Infección trasplacentaria con los biotipos CP y NCP del vDVB	16
Cuadro 5.1	Cepa utilizada en este trabajo	25
Cuadro 5.2	Muestras utilizadas en este trabajo	26
Cuadro 5.3	Iniciadores utilizados para amplificar un fragmento de la región 5'UTR	28
Cuadro 5.4	Reactivos utilizados en la RT	28
Cuadro 5.5	Reactivos utilizados en la PCR	29
Cuadro 5.6	Cepas de referencia utilizadas para el análisis filogenético	31
Cuadro 6.1	Porcentajes de identidad	40

ABREVIATURAS UTILIZADAS

°C	Grados Celcius
aa	Aminoácido (s)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CP	Citopático
DEPC	Dietilpirocarbonato
DVB	Diarrea viral bovina
EM	Enfermedad de las mucosas
kb	kilobases
kDa	Kilodaltones
MDBK	<i>Madin-Darby Bovine Kidney</i>
µl	Microlitros
µM	Micromolar
mM	Milimolar
min	Minutos
NADL	<i>National Animal Disease Laboratory</i>
nm	Nanómetros
ng	Nanogramos
NCP	No citipático
ORF	<i>Open reading frame</i> ; marco de lectura
pb	Pares de bases
PI	Persistentemente infectado
U	Unidades
UTR	<i>Untranslated region</i> ; región no traducida
rpm	Revoluciones por minuto
seg	segundos
SFB	Suero fetal bovino
vDVB	Virus de la diarrea viral bovina
vDVB-1	Virus de la diarrea viral bovina tipo 1
vDVB -2	Virus de la diarrea viral bovina tipo 2
vEF	Virus de la enfermedad de las fronteras
vFPC	Virus de la fiebre porcina clásica
%	Porcentaje

RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina (vDVB) es el agente etiológico de la diarrea viral bovina (DVB), una enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones ganaderas. El vDVB tiene la capacidad de cruzar la barrera trasplacentaria y producir infecciones persistentes en los fetos, por lo cual, se puede encontrar en el suero fetal bovino (SFB). Por esta razón el SFB empleado como promotor de crecimiento de cultivos celulares, puede estar contener al vDVB; contaminando, a su vez, los cultivos celulares donde se emplea. Así mismo, debido a que, tanto el SFB como los cultivos celulares son utilizados para la producción de vacunas, estos inmunógenos también pueden resultar contaminados. Durante el proceso de producción de vacunas en nuestro país, se aplican diversas pruebas de control de calidad con el propósito de verificar que los SFB y cultivos celulares estén libres del vDVB, ya que existen reportes en otros países, de brotes de la enfermedad causados por el uso de vacunas contaminadas. Sin embargo, por lo general las pruebas existentes no alcanzan la sensibilidad necesaria para la identificación de este agente. Con base en lo anterior, se realizó la técnica de Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) con el objetivo de detectar la presencia del genoma del vDVB en SFB, líneas celulares y vacunas comerciales. Para la realización de la RT-PCR se amplificó un fragmento de la región conservada 5'UTR (*Untranslated region*) del genoma del vDVB, utilizando iniciadores previamente reportados. Los resultados demostraron que en 12 de 19 muestras procesadas, se obtuvieron amplificadas, lo cual representa un 79.16% del total. Los productos amplificadas

obtenidos mediante la RT-PCR fueron secuenciados y caracterizados filogenéticamente y confirmaron la presencia de porciones del genoma del vDVB en vacunas de uso veterinario, sueros fetales bovinos y líneas celulares, indicando la existencia de este virus como contaminante de dichos productos biológicos en México.

ABSTRACT

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is the name of the agent which causes the bovine viral diarrhoea disease, an endemic disease spread in the bovine populations worldwide. This virus can cross the placenta and persist in infected animals, that's the reason that we can find it in biological products such as fetal bovine serum (FBS). The FBS is widely used in cell culture as a growth promoting factor which can be contaminated with BVDV and the cell culture as well. FBS and cell culture, both are used in the vaccine production. In this process many tests are applied in control programmes in order to verify that the biological products are BVDV free, there are reports about vaccine contamination that lead to new outbreaks. Therefore, it was suggested that RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) should be the test of choice with the aim to identify BVDV in FBS, cell culture and commercial vaccines. The RT-PCR was performed to amplify a fragment of the 5'UTR (Untranslated region) a conserved region, using primers previously reported. These primers were used to detect BVDV by amplifying a 293 bp sequence. Our results show the presence of nucleic acids that correspond to BVDV in veterinarian vaccines and biological products like FBS and cell lines as well. Likewise, based in DNA sequencing we confirmed the results that we obtained by RT-PCR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

La enfermedad de la diarrea viral bovina (DVB) fue descrita por primera vez en 1946 por dos grupos de investigación: uno de ellos, P. Olafson *et al.*, en Ithaca, Nueva York¹, la refirieron como una enfermedad caracterizada por leucopenia, depresión, fiebre, diarrea, deshidratación, anorexia, sialorrea, descarga nasal, hemorragias y erosiones gastrointestinales en el ganado bovino. Asimismo, T. Childs hizo una descripción semejante en Saskatchewan, Canadá.² El virus de la diarrea viral bovina (vDVB) fue identificado hasta 1968 aproximadamente y es el nombre que se atribuyó al agente etiológico de la enfermedad³.

Actualmente la DVB es una entidad nosológica endémica en una gran cantidad de poblaciones ganaderas y presenta una distribución mundial⁴. Afecta a los ungulados del orden *Artiodactila*; es decir, infecta a porcinos, bovinos, ovinos, caprinos, alpacas, llamas, camellos, búfalos de agua, antílopes y venados⁵.

El impacto económico de esta enfermedad ha sido calculado en países como Reino Unido, Países Bajos y Dinamarca en donde el costo oscila entre los \$45 y \$410 dólares por vaca infectada^{6, 7, 8, 9}. En otros países en los cuales se han calculado las pérdidas atribuibles a la infección por DVB, estas oscilan entre los \$8-\$46 millones de dólares por millón de partos^{10, 11, 12, 13}.

1.2 CARACTERÍSTICAS DEL vDVB

El vDVB pertenece a la familia *Flaviviridae* y género *Pestivirus*, el genoma del virus es del tipo ARN de cadena simple con polaridad positiva, no segmentado, y con una longitud de 12.3 kb, el cual codifica para la producción de proteínas virales estructurales y no estructurales¹⁴. Las proteínas estructurales son la proteína C y tres tipos de glicoproteínas de envoltura E^{ms}, E1 y E2; codificados por los genes C, gp44/48, gp33, gp55 respectivamente. El vDVB codifica para la producción de 8 o 9 proteínas no estructurales. La proteína N^{pro} es codificada por el gen p20 y tiene función de proteasa. En caso de la proteína p7 no se conoce su función exacta sin embargo, se sabe que se requiere para la producción de partículas virales infecciosas aunque no se requiere para la replicación del virus. La proteína NS2 la cual es codificada por el gen p54 es una cisteína proteasa responsable del procesamiento de la proteína NS2-3 en NS2 y NS3. La proteína NS3 actúa es expresada en todas las cepas citopáticas del vDVB; la tercera parte de la porción C-terminal codifica una serina proteasa que funciona con NS4A para mediar el procesamiento de todos los sitios de escisión. Es responsable de los cortes que se hacen desde ella hacia adelante en la poliproteína incluyendo su propio carboxilo terminal entre NS3 y NS4A, NS4A y B, NS4B y NS5A, y NS5A y B, pero no del corte en NS2-3¹⁵ y es codificada por el gen p80. La proteína NS4A codificada por el gen p10 actúa como un cofactor de la proteína NS3. La proteína NS4B y NS5A forman parte del complejo de replicación del virus y son codificadas por los genes p38 y p58 respectivamente. Por último la proteína NS5B que es codificada por el gen p75 y es la ARN dependiente de ARN polimerasa la cual es

necesaria para el ensamblaje y liberación de las partículas virales de la célula hospedadora¹⁶.

La familia *Flaviviridae* está compuesta por los géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. El vDVB junto con el virus de la enfermedad de las fronteras (vEF) y el virus de la fiebre porcina clásica (vFPC) forman el género *Pestivirus* (Cuadro 1).

Familia	Género	Especies
<i>Flaviviridae</i>	<i>Pestivirus</i>	-Virus de la Fiebre Porcina Clásica -Virus de la Enfermedad de las Fronteras -Virus de la Diarrea Viral Bovina

Cuadro 1.1 Familia *Falviviridae*¹⁶

Las partículas virales consisten de una envoltura lipídica compuesta de una bicapa de fosfolípidos que proviene de las células que infecta. Esta recubre a la cápside que contiene el genoma viral que, en comparación con los demás miembros de la familia, es pleomórfica. En la práctica, la variación en el tamaño de las partículas envueltas impide su identificación por microscopía electrónica en muestras clínicas¹⁷. El vDVB tiene un diámetro de 40-60 nm aproximadamente¹⁸.

1.2.1 GENOTIPOS

Con base en la composición genética del genoma completo, el vDVB está clasificado en los genotipos: vDVB-1 y vDVB-2^{16,19, 20} así como el grupo tentativo denominado vDVB3²¹.

La heterogeneidad genética que existe en el vDVB, se debe a la variabilidad inherente al hecho de poseer un genoma de ARN de cadena sencilla, que carece de una exonucleasa eficiente para corregir las bases mal incorporadas, ocasionando sustituciones de bases con una alta frecuencia (1 error por cada 10^4 nucleótidos polimerizados). Es decir; mutaciones puntuales “suceden” en cada ronda de replicación del virus. No obstante el vDVB utiliza esto como una estrategia para persistir, originando cepas mutantes que evaden la respuesta inmunológica por parte del hospedador²². El impacto biológico que tiene esta heterogeneidad se observa con las diferencias en el genotipo, el biotipo y la virulencia. Se propone que la acumulación de estas mutaciones puntuales, ha derivado en la segregación del vDVB en especies genéticamente distintas (Figura 1.1)^{23, 24, 25}.

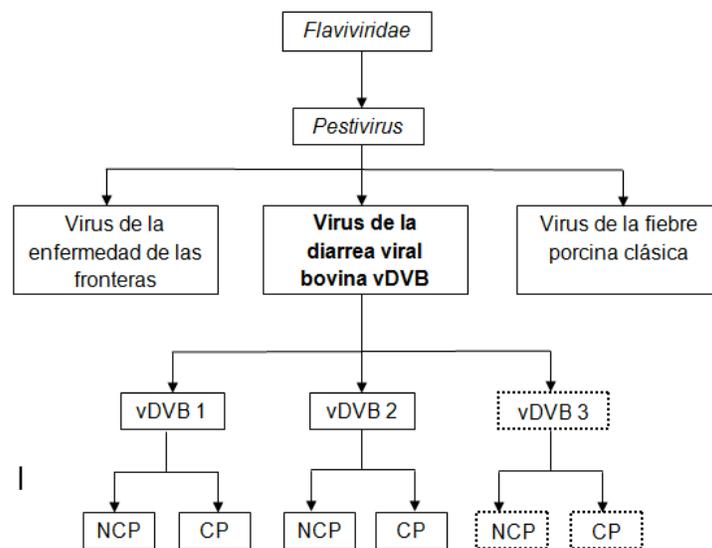


Figura 1.1 Clasificación del vDVB²⁵

El genotipo vDVB-1 es particularmente diverso, se conocen al menos, 16 diferentes subgenotipos definidos genéticamente (vDVB 1a-vDVB 1p)^{24, 26, 27, 28}.

La capacidad del vDVB para infectar a las especies del orden *Artiodactyla* como bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, camélidos entre otros; crea otra oportunidad para la diversificación, ya sea por la adaptación a un nuevo hospedador o por evolución divergente. Sin embargo, el vDVB aislado de cerdos y ovejas tiene características biológicas y antigénicas similares a los aislados del bovino²⁹.

1.2.2 BIOTIPOS

Cada genotipo tiene a su vez dos biotipos con base en su habilidad para producir efecto citopático en cultivo celular, pero sin considerar la capacidad para producir enfermedad en el hospedero. Estos son el biotipo el citopático (CP) el cual produce vacuolización citoplasmática³⁰ así como muerte celular y el no citopático (NCP) que se replica sin producir daño celular^{31, 32, 33} (Figura 1.2). De los dos biotipos, el NCP es el que está distribuido ampliamente en el ganado²⁴, pues se relaciona con más del 90% de las infecciones³⁴. Es el único capaz de establecer una infección persistente, es decir da lugar a la presencia de animales persistentemente infectados (PI)^{35, 36, 37}.

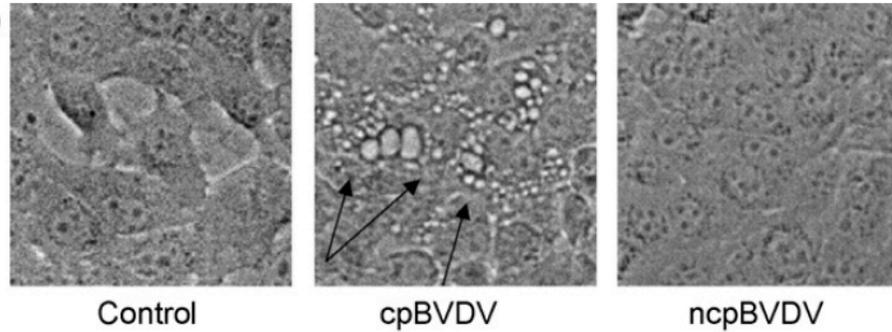


Figura 1.2 Análisis microscópico de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) testigo, células infectadas con vDVB CP y vDVB NCP a las 24 horas post-infección. Las flechas indican las células vacuolizadas³³.

La diferencia entre el biotipo CP y NCP radica en la producción de la proteína no estructural NS3, considerada como una proteína que sirve de marca para la identificación del vDVB CP³⁸ (Figura 1.3).

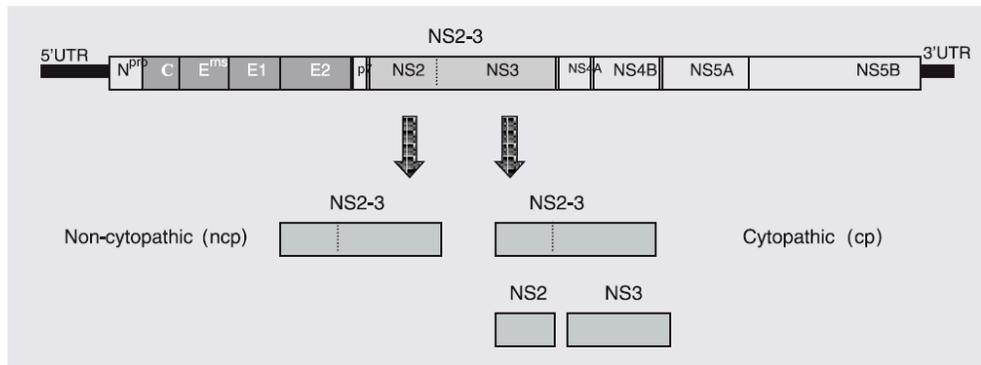


Figura 1.3. Organización del genoma del vDVB y procesamiento del polipéptido NS2-3 en los biotipos CP y NCP. En el biotipo NCP, se encuentra el polipéptido NS3 y en biotipos CP se encuentran los polipéptidos NS2-3 y el NS3³⁹.

Los análisis moleculares en ambos biotipos han demostrado que la variedad de CP se origina de un virus NCP homólogo por medio de mecanismos genéticos diferentes descritos en el cuadro 1.2.

Mecanismos genéticos propuestos para la expresión de NS3
Inserciones de secuencias de ARN celular en NS2-3 cerca del límite entre NS2 y NS3 ^{40, 41} .
Duplicaciones de secuencias genéticas del vDVB insertadas en la región NS2-3 codificante ⁴² .
Duplicación corriente abajo del gen NS3 ⁴³ .
Expresión de NS3 de un genoma ARN defectuoso ⁴⁴ .
Puntos de mutación en el gen NS2-3 ⁴⁵ .
Inserciones de secuencias celulares mas duplicaciones del gen viral en la porción amino terminal de la poliproteína ⁴⁶ .
Reordenamiento genómico del gen p125/p80 ⁴⁷ .
En el caso de la cepa americana NADL el biotipo CP contiene una inserción de 270 nucleótidos en NS2 que potencializa la escisión parcial de NS2-3 ⁴⁸ .
La inserción de una secuencia de ARN celular que codifica para la ubiquitina en la porción amino terminal de la proteína NS3, lo cual su escisión de la proteína NS2-3 por cualquier proteasa celular ⁴⁹ .

Cuadro 1.2. Mecanismos genéticos propuestos para la expresión de NS3

1.2.3 REPLICACIÓN VIRAL

El virus tiene tropismo por linfocitos, macrófagos, células epiteliales^{50,51} y células germinales de ambos sexos²⁵. Después del contacto con la mucosa nasal u oral, la replicación ocurre en células epiteliales y en tonsilas palatinas.

Se ha encontrado que la entrada del vDVB a células de origen bovino es un proceso que requiere de varias etapas que incluyen la unión de viriones a receptores celulares, internación y fusión de membrana. La unión a las células blanco involucra a las glicoproteínas virales Erns y E2, en donde la glicoproteína

Erns interactúa con los glucosaminoglucanos de la superficie celular⁵² y E2 lo hace con proteínas de membrana⁵³

Los receptores celulares que se han identificado para el vDVB que son:

-CD46⁵⁴

-Heparan sulfato

-LDLR (low-density lipoprotein receptor) ^{54, 55}.

La penetración del vDVB a las células de origen bovino ocurre por endocitosis mediada por receptor a través de vesículas cubiertas de clatrina. La membrana de la vesícula endocítica se fusiona con la envoltura viral, en un proceso de fusión inducido por la disminución del pH endosomal y mediado por glicoproteínas virales⁵⁶.

El proceso de desnudamiento ocurre cuando el material genético del virus es liberado en el citoplasma y la cápside es removida por medio de enzimas celulares.

La replicación del genoma viral se lleva a cabo en el citoplasma de la célula hospedadora, ahí las partículas virales son ensambladas y adquieren su envoltura a partir de las membranas intracelulares de las vesículas citoplasmáticas, que se transportan a través de la vía secretoria y son liberadas por exocitosis⁵⁷.

El ARN de cadena positiva puede ser traducido sin transcripción previa, es decir, actúa como un ARN mensajero. Como resultado de la traducción del mensajero se genera una poliproteína de aproximadamente 4000 aa que es procesada y segmentada, para dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del

virus, este proceso es el resultado de la actividad de proteasas celulares y virales. Dichas proteínas escindidas, tanto estructurales como no estructurales, contribuyen al proceso de replicación del ARN⁵⁸ (Figura 1.4).

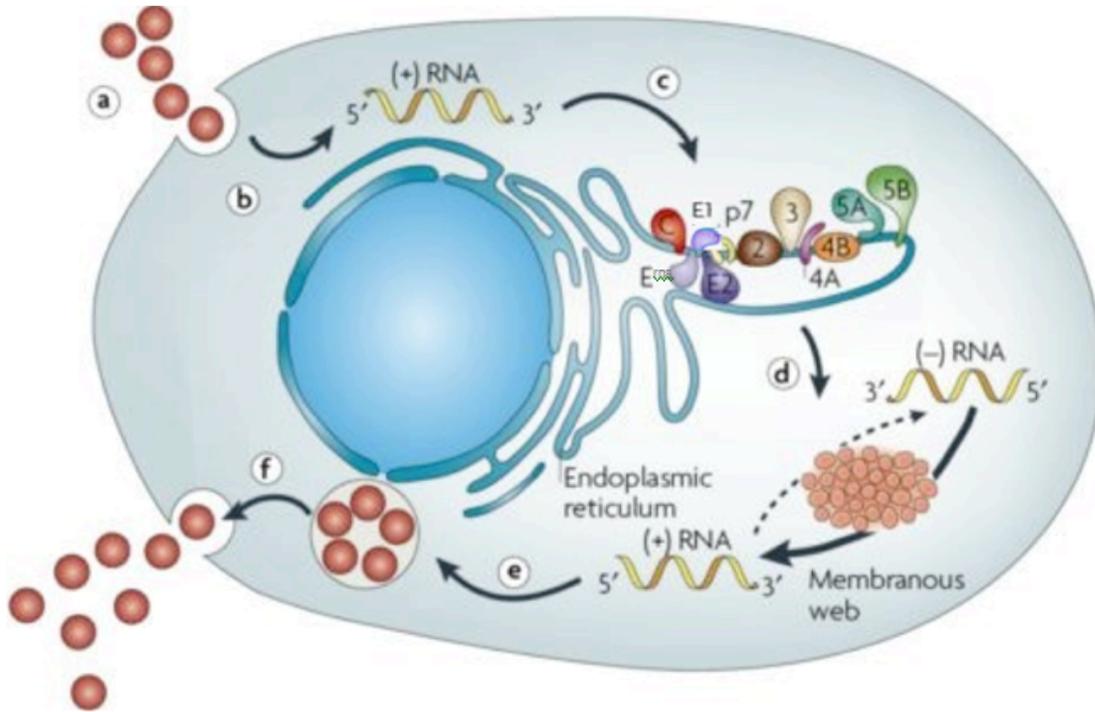


Figura 1.4. Replicación viral. Modificado de Moradpour D. et al Nat. Rev. Microbiol. 2007; 5: 453-467⁵⁹

1.3 PATOGENIA

La ruta natural de transmisión es oronasal por contacto directo con las secreciones de animales infectados, el virus se replica en la mucosa nasal y las tonsilas palatinas de donde los linfocitos propagan el virus por todo el cuerpo^{60, 61}.

La enfermedad producida por el vDVB tiene diferentes manifestaciones clínicas que incluyen las variantes reproductiva, respiratoria, síndrome hemorrágico, enfermedad de las mucosas y mala condición de animales persistentemente

infectados (PI). Factores como el genotipo, biotipo, virulencia de cada una de las cepas; así como la edad, estado fisiológico y el estado inmune del hospedador, determinarán el tipo de presentación de la enfermedad; los factores virales relacionados con la cepa o el biotipo, así como los relacionados con el hospedero son la causa de gama tan amplia de signos clínicos y lesiones.

La virulencia no está correlacionada con el biotipo, ya que tanto en el vDVB-1 como el vDVB-2 y el vDVB-3 presentan los biotipos NCP y CP, teniendo un amplio espectro de virulencia. Sin embargo, la frecuencia de cepas virulentas parece ser mayor en el vDVB- 2 que en el vDVB-1⁵⁷.

Para la discusión de la patogénesis de la infección por el vDVB se consideran los siguientes cuadros clínicos (Figura 1.5):

-Diarrea viral bovina (Infección en un animal inmunocompetente):

- Infección aguda
- Infección en bovinos no gestantes
- Infección en bovinos gestantes (trasplacentaria /intrauterina)
- Infección persistente
- Síndrome hemorrágico

- Enfermedad de las mucosas (infección en un animal inmunotolerante)⁵⁷

1.3.1 DIARREA VIRAL BOVINA

Infección aguda

La infección aguda se desarrolla cuando bovinos susceptibles (seronegativos), inmunocompetentes son infectados con el vDVB⁵⁷, en especial en animales de 6 a 24 meses de edad⁶² y es causada en su mayoría por el vDVB NCP⁶³. La infección aguda se caracteriza por pirexia y leucopenia 3-7 días post-infección²⁵. Los animales susceptibles pueden presentar diarrea, descargas oculares y nasales, así como erosiones en mucosa oral. En el caso de vacas lecheras, disminuye la producción láctea. Debido a la inmunosupresión asociada a la infección la enfermedad también se puede manifestar por infecciones respiratorias e intestinales oportunistas.⁶⁴

Infección en bovinos no gestantes

En la mayoría de los casos las infecciones en bovinos susceptibles no gestantes son subclínicas, pero dependiendo de la cepa y genotipo se puede llegar a presentar la enfermedad clínica²⁴.

El virus se puede detectar en la mayoría de las secreciones a partir de los 4-10 días post infección de manera intermitente y en bajos niveles²⁵.

Infección en bovinos gestantes

El vDVB es capaz de atravesar la barrera trasplacentaria e infectar al feto. La infección congénita resulta en un amplio espectro de anomalías como reabsorción embrionaria, aborto, momificación, malformaciones congénitas,

nacimiento de terneros débiles, de bajo peso y tamaño, nacimiento de animales persistentemente infectados y aún el nacimiento de animales sanos⁶⁵.

Los signos clínicos que se pueden observar son: fiebre desde el día 6-9 post infección, inapetencia y lesiones en mucosa. La infección en terneros con frecuencia está asociada con signos respiratorios y gastrointestinales como tos y diarrea que pueden ser el resultado de infecciones concurrentes⁶⁶.

Infección persistente

El biotipo NCP es responsable de las infecciones *in utero* cuando ésta se adquiere de entre los días 18 a los 125 de gestación^{67,63}, antes de que ocurra el proceso de distinción de lo propio y lo no propio. Por esta razón, se produce una infección asintomática persistente al establecerse una tolerancia hacia el vDVB. Los animales persistentemente infectados (PI) son virémicos e incapaces de sintetizar anticuerpos o activar linfocitos T frente al virus debido a su inmunotolerancia al mismo, pero si éstos se exponen a cepas heterólogas del vDVB podrán producir anticuerpos neutralizantes contra las segundas⁶¹.

Los animales PI eliminan grandes cantidades de virus por las secreciones actuando como fuente principal de vDVB para los otros animales⁶⁸. Las cepas del vDVB NCP con la habilidad de establecer una infección persistente son el biotipo predominante en la naturaleza y los más aislados en el ganado bovino⁶⁹. Por el contrario, el vDVB CP es capaz de atravesar la placenta e infectar al feto, pero no tiene la capacidad de establecer una infección persistente (Cuadro 1.3)^{70,71}.

Los animales PI, pueden nacer de manera normal, y llegar a la edad adulta y reproducirse. De ser así, el virus se sigue replicando durante toda la vida de los animales infectados y es continuamente excretado al medio⁷² teniendo la capacidad de transmitirse a hembras susceptibles y los fetos para que de esta manera la progenie de estos animales siempre sea PI.

Infección trasplacentaria con el vDVB biotipo CP	
Antes de los 100 días de gestación	Reabsorción o expulsión del embrión o feto, meses o días después de la infección.
Periodo de los 100-125 días	Efectos teratogénicos.
Infección trasplacentaria con el vDVB biotipo NCP	
Antes de los 100-125 días de gestación	Inmunotolerancia que resulta en el nacimiento de un ternero PI.
Después de los 150 días de gestación	Los fetos montan una respuesta inmune relativamente normal y nacen con anticuerpos circulantes.

Cuadro 1.3. Infección trasplacentaria con los biotipos CP y NCP del vDVB ⁷³

Síndrome hemorrágico

En la DVB existe una condición fatal denominada síndrome hemorrágico está asociada al vDVB tipo 2 y biotipo NCP^{25,74}. Esta se caracteriza por la presentación de mucosas anémicas con hemorragias petequiales y equimóticas, hipertermia, hemorragia en múltiples sistemas orgánicos, diarrea sanguinolenta, epistaxis,

sangrado constante en sitios de inyección, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte^{75,76}.

1.3.2 ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS (EM)

La enfermedad de las mucosas es otra condición fatal, que se presenta principalmente en animales jóvenes de aproximadamente 6 a 18 meses de edad, con signos y lesiones que incluyen erosiones en la mucosa oral, fiebre, depresión, sialorrea, diarrea profusa y una pérdida rápida de la condición corporal⁷⁷.

La EM solo ocurre en animales PI, los cuales después pueden desarrollar la enfermedad como resultado de una sobreinfección con una cepa vDVB CP homóloga⁵⁰ de origen exógeno o generada de cambios genéticos o recombinación del ARN de las cepas NCP residentes⁷⁸.

Se ha encontrado que en algunos casos de EM, ambos biotipos pueden ser aislados, siendo éstos antigénicamente similares. Existe la hipótesis de que en la mayoría de los casos de EM, la superinfección con el virus CP proviene de la mutación de un virus NCP persistente^{79,80}.

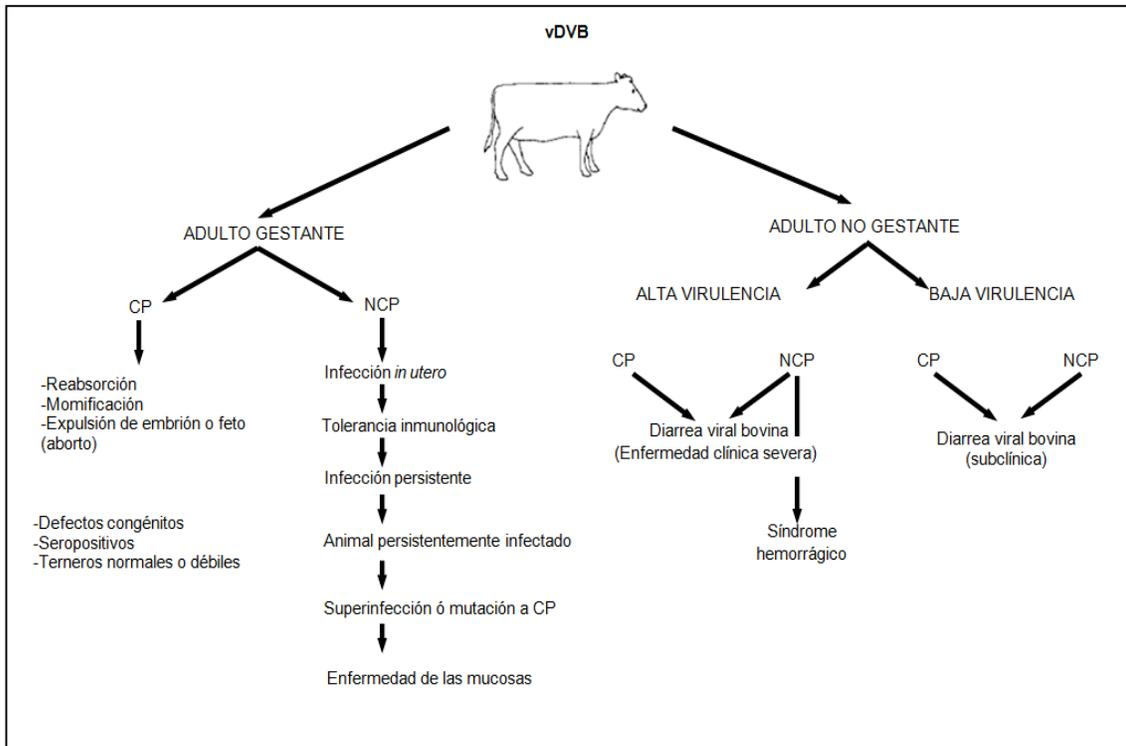


Figura 1.5 Interpretación de las presentaciones clínicas causadas por la infección con el vDVB

1.4 CONTAMINACIÓN POR vDVB

El vDVB es un contaminante común del suero fetal bovino (SFB), debido a la capacidad que tiene el virus de propagación transplacentaria y de establecer una infección persistente en animales inmunológicamente inmaduros⁸¹.

La combinación de altas concentraciones de vDVB en el suero de animales PI y la alta prevalencia de las infecciones persistentes en animales en gestación, son los principales responsables de la presencia del vDVB en el suero de terneros. Por lo general el SFB que se distribuye comercialmente, se obtiene a partir de una mezcla de sueros obtenidos de entre 3500-4000 fetos, por lo tanto diferentes cepas de vDVB pueden encontrarse contaminando el suero. Después, por lo

general el lote se somete a procedimientos destinados a la inactivación de cualquier virus activo. Sin embargo, debido a que la eficacia de las medidas de inactivación no llegan al 100%, el uso del SFB en la producción de vacunas activas, es una de las mayores preocupaciones por el uso de estos productos en bovinos⁸², ya que el vDVB resulta ser la mayor fuente contaminación en vacunas de uso veterinario y para humanos⁸³.

El SFB se utiliza comúnmente como promotor del crecimiento de las células en cultivo usadas para la preparación de vacunas⁸³ y lotes de virus semilla⁸². En un estudio realizado en Japón, se encontró que el 57.1% de los SFB provenientes de diferentes partes del mundo fueron positivos a Pestivirus, entre los cuales se logró aislar al vDVB tanto del tipo 1 como del tipo 2 en algunos lotes⁸⁴.

El aislamiento del vDVB es difícil debido a que la mayoría de las cepas de los *pestivirus* (99%) presentes en SFB son NCP al replicarse en cultivo celular⁸⁵. A su vez, se han detectado líneas celulares de origen bovino, ovino, caprino, de ciervo, bisonte, hámster, conejo, mono, gato doméstico; obtenidas del ATCC (*American Type Culture Collection*), contaminadas con el vDVB⁸⁶.

Debido a lo anterior, la contaminación de vacunas por el vDVB sigue siendo un problema que enfrentan los fabricantes de vacunas para su uso en humanos y animales. A pesar de los progresos en la fabricación y control de vacunas, se han reportado infecciones iatrogénicas en bovinos y cerdos por el uso de vacunas contaminadas^{87, 88, 89, 90}.

Una de las formas más seguras para evitar la posible contaminación con el vDVB, podría ser controlando del origen del SFB. Es decir, garantizar que los animales

de los cuales se obtiene el SFB están libres del virus. No obstante, por razones técnicas y económicas, es difícil asegurar que tanto el SFB como las líneas celulares y virus semillas estén libres del agente. Por esta razón es necesaria la aplicación de técnicas que permitan determinar que el SFB, líneas celulares y vacunas estén libres del vDVB, así como la aplicación de técnicas eficaces para inactivar al virus y eliminar la contaminación.

2. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, existen estudios publicados que reportan la presencia del vDVB en SFB, líneas celulares y vacunas y el riesgo que implica el uso de estos productos. Sin embargo, en la actualidad no hay información disponible que describa la presencia y los tipos de vDVB presentes en productos de uso veterinario en México. Entonces, es necesario descartar la presencia de este virus como contaminante en los productos terminados.

Por otro lado para las vacunas que contienen como agente vacunal al vDVB, se hace fundamental verificar su presencia por medio de la aplicación de pruebas de identidad eficaces en estos productos.

3. HIPÓTESIS

La RT-PCR y la secuenciación permitirán determinar la presencia y los tipos del vDVB que se encuentran como contaminantes de SFB, líneas celulares y vacunas de uso veterinario que se comercializan en México; así como la identidad de cepas vacunales del vDVB utilizadas en vacunas de uso veterinario.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia del genoma del virus de la Diarrea Viral Bovina como contaminante en suero fetal bovino, líneas celulares y vacunas de uso veterinario y la identidad de cepas vacunales, mediante el empleo de las pruebas de RT-PCR y secuenciación, para evitar el uso de productos contaminados, brotes de la enfermedad y reducir las pérdidas económicas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Estandarizar la técnica de la RT-PCR a partir de un virus de referencia (NADL), amplificando un fragmento de la región 5'UTR⁹¹ con iniciadores previamente reportados.

II. Determinar la presencia del genoma del vDVB como contaminante en SFB, líneas celulares y vacunas virales activas comerciales para su uso en bovinos que no contengan como agente vacunal el vDVB.

III. Por medio del método de secuenciación, caracterizar el fragmento de la región 5'UTR de cada una de las muestras positivas y establecer la relación filogenética entre los diferentes tipos de virus detectados y otros genotipos previamente reportados; para confirmar la presencia del vDVB como contaminante así como su diversidad genética.

IV. Determinar la presencia e identidad de las cepas del vDVB en vacunas virales activas comerciales para su uso en bovinos que contengan como agente vacunal el vDVB, y establecerlas como pruebas de identidad de inmunógenos virales para verificar las cepas contenidas en los productos virales.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Cepa del vDVB

Como testigo positivo se utilizó la cepa NADL (Cuadro 5.1); la cual fue replicada en la línea celular MDBK (Madin–Darby Bovine Kidney) en Medio Mínimo Esencial (Opti-MEM^I) sin antibióticos y suplementado con suero de caballo al 4% ^{II}. A las 24 horas de crecimiento, los cultivos celulares con el 80% de confluencia fueron infectados con el inóculo viral durante una hora a temperatura ambiente. Después de ese tiempo se le agregó medio fresco y se incubaron a 37°C ^{III} por aproximadamente 48 horas, después de las cuales se realizó la lisis de las células por congelación y descongelación^{IV}.

Los cultivos lisados fueron centrifugados^V a 3000 rpm por 15 min para quitar detritus celulares. Los sobrenadantes se fraccionaron y se conservaron en congelación a -70°C ^{IV} hasta su uso.

Cepa	Descripción	Referencia
vDVB NADL (CP)	Virus de la diarrea viral bovina tipo 1, biotipo citopático. Origen: bazo de un caso de DVB en <i>National Animal Disease Laboratory</i> (NADL) Iowa 1962	ATCC donada por la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva

Cuadro 5.1 Cepa utilizada en este trabajo

^I GIBCO®

^{II} ATCC

^{III} Incubadora CO2 SANYO modelo MCO-19AIC

^{IV} Ultracongelador SO-LOW modelo U85-L3

^V IEC International modelo PR-2

5.2. Muestras de trabajo

Además de la cepa de referencia, se procesaron vacunas virales para su uso en bovinos, líneas celulares y sueros fetales bovinos comerciales cuyo origen se mantuvo confidencial. Ver cuadro 5.2

Tipo de muestra/ Identificación	Descripción
Vacuna A	Vacuna de virus inactivado de DVB tipo 1 e IBR
Vacuna B	Vacuna de virus activo modificado de DVB, PI3, vSRB e IBR
Vacuna C	Vacuna de virus activo modificado de DVB, PI3, vSRB e IBR
Vacuna D	Vacuna de virus activo modificado de DVB, PI3, vSRB e IBR
Vacuna E	Vacuna de virus activo modificado de DVB, PI3 y vSRB
Vacuna F	Vacuna de virus activo modificado de DVB, PI3 y vSRB
Vacuna G	Vacuna de virus activo modificado de PI3 e IBR
Vacuna H	Vacuna de virus activo modificado del virus de la rabia
Vacuna I	Vacuna de virus activo modificado del virus de la rabia
Vacuna J	Vacuna de virus activo modificado del virus de la rabia
Vacuna K	Vacuna de virus activo modificado del virus de la rabia
Vacuna L	Vacuna de virus activo modificado del virus de la rabia
SFB/ 1	Suero fetal bovino comercial
SFB/ 2	Suero fetal bovino comercial
SFB/ 3	Suero fetal bovino comercial
SFB/ 4	Suero fetal bovino comercial
SFB/ 5	Suero fetal bovino comercial
SFB/ 6	Suero fetal bovino comercial
SFB/ 7	Suero fetal bovino comercial
SFB/ 8	Suero fetal bovino comercial
SFB/ 9	Suero fetal bovino comercial
SFB/ 10	Suero fetal bovino comercial
Línea celular/ 1	Células BHK-21
Línea celular/ 2	Células MDBK
Línea celular/ 3	Células MDBK
Línea celular/ 4	Células MDCK
Línea celular/ 5	Células MDBK
Línea celular/ 6	Células MDBK
Línea celular/ 7	Células MDBK
Línea celular/ 8	Células MDBK

Cuadro 5.2 Muestras utilizadas en este trabajo

5.2.1 Extracción de ARN total

La obtención del ARN total se realizó utilizando Trizol® Reagent ^{VI}, de acuerdo con las indicaciones del producto y en campana de flujo laminar ^{VII}. Brevemente, la extracción del ARN de las cepa testigo se realizó de forma paralela con las muestras (vacunas, SFB y líneas celulares). Por cada 700 µl de muestra se adicionaron 300 µl de Trizol® Reagent ^{VI}, las muestras fueron incubadas por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se le adicionaron 150 µl de cloroformo ^{VIII}. Se mezclaron en homogeneizador ^{IX} por 15 seg aproximadamente para después incubarse por 7 min en hielo. Concluido este paso, se centrifugaron a 12 000 rpm por 20 min a 4°C ^X. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos, a los que se les adicionaron 500 µl de isopropanol ^{XI} mezclando por inversión. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente fueron centrifugadas a 14 000 rpm por 20 min a 4°C ^X. Se decantaron los sobrenadantes y se les adicionó 1ml de etanol ^{XII} al 75% por cada muestra y nuevamente se centrifugaron 14 000 rpm por 10 min a 4°C ^X. Se decantó el etanol y se dejaron secar las pastillas aproximadamente 10 min en una campana de flujo laminar ^{VII}. Posteriormente se suspendieron con 20 µl de agua con DEPC (ver Anexo 1), homogenizando varias veces con micropipeta, para después incubarse en baño María ^{XIII} a 55-60°C por 5 min, y finalmente almacenarse a -70°C ^{IV}. El ARN total fue cuantificado en todas las muestras por medio de espectrofotometría ^{XIV}.

^{VI} Invitrogen®
^{VII} NUAIRE, modelo UN440-400
^{VIII} J.T. Baker®
^{IX} MRC Laboratory modelo UVM 1000
^X Thermo Scientific , modelo LRS8405

^{XI} Sigma-Aldrich
^{XII} J.T. Baker®
^{IV} Ultracongelador SO-LOW modelo U85-L3
^{XIII} Accesolab, modelo SM
^{XIV} Nanodrop Spectrophotometer ND1000

5.3 Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Se amplificó un fragmento de la región 5'UTR por medio de RT-PCR. Se utilizaron los iniciadores previamente reportados por T.J. Mahony *et al*; 2005 para identificación del vDVB. Se obtuvieron amplificadores de 293 pb de la región 5'UTR. Las secuencias de los iniciadores están descritas en el cuadro 5.3.

Iniciadores	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del producto (pb)
Sentido (5'UTR)	CTAGCCATGCCCTTAGTAGGACTA	293
Antisentido (5'UTR)	CAACTCCATGTGCCATGTACAGCA	

Cuadro 5.3 Iniciadores utilizados para amplificar un fragmento de la región 5'UTR

Los reactivos utilizados en la RT-PCR, así como su concentración se muestran en el cuadro 5.4 y 5.5

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
RT	5U/μl	1U/reacción
Buffer 10X	10X	1X
dNTP's	10mM	200μM
Iniciador antisentido	20μM	0.2 μM
Inhibidor de RNasas	10U/μl	1U/reacción
Agua con DEPC	c.b.p. 20 μl	
ARN	100ng	
Volumen final	20 μl	

Cuadro 5.4 Reactivos utilizados en la RT

La mezcla sé incubó^{xv} a 37°C por una h y posteriormente a 65°C por 5 min.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10X	1X
MgCl ₂	50mM	1.5 mM
dNTP's	10mM	200µM
Iniciador sentido	20µM	0.2 µM
Iniciador antisentido	20µM	0.2 µM
Taq polimerasa	5U/µl	1U/reacción
cADN	100ng	
Agua	cbp 25 µl	
Volumen final	25 µl	

Cuadro 5.5 Reactivos utilizados en la PCR

Las condiciones establecidas en el termociclador^{xv} para la PCR se muestran a continuación (**Figura 5.1**)

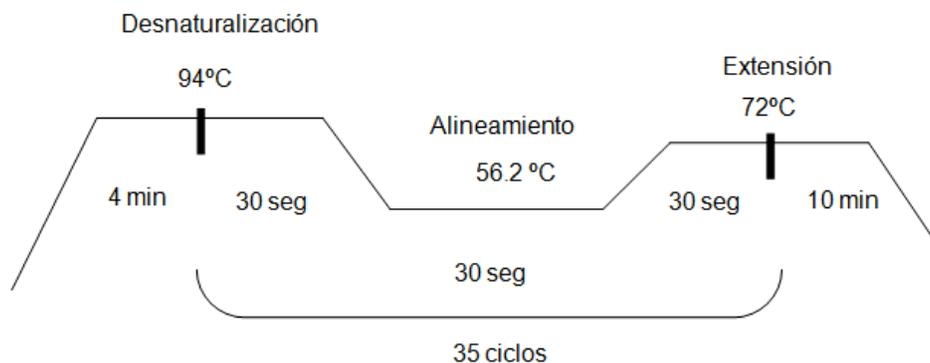


Figura 5.1 Condiciones de la PCR. Condiciones de la temperatura y ciclos en la PCR para 5'UTR establecidas en el termociclador.

Los productos de la PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en TAE teñido con *GelRed Nucleic Acid*®^{XVI}.

5.3.1 Aplicación de la técnica de RT-PCR en muestras de trabajo

Se realizó la RT-PCR de todas las muestras procesadas. En total se analizaron 6 vacunas que contenían el vDVB como agente vacunal y 6 vacunas que no lo contenían. Así mismo se analizaron muestras de 10 SFB comerciales y 8 líneas celulares provenientes de laboratorios mexicanos productores de vacunas.

5.4 Secuenciación y análisis filogenético

Una vez obtenidos los productos de la RT-PCR estos fueron purificados utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction*®^{XVII}, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR fueron enviados al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM donde fueron secuenciados.

Una vez obtenidas las secuencias de las muestras procesadas y la de la cepa testigo, éstas fueron comparadas con secuencias de referencia previamente reportadas en la base de datos del *GenBank*, las cuales se describen en el Cuadro 5.6.

Virus	Nombre de cepa de referencia	No. de acceso al GenBank
vDVB tipo 1	NADL	M311382,
	SD-1	M96751
	Osloss	M96687
	NY-1	L32879
	Bovine viral diarrhea virus 1 <i>isolate</i> H2- 190/MX	JN967732
	Bovine viral diarrhea virus 1 <i>isolate</i> B5-132/MX	JN967746
	Bovine viral diarrhea virus 1 <i>isolate</i> K6-4/MX	JN967741
vDVB tipo 2	890	L32886
	NY-93	AF502399
	34b	AF244952
	Soldan	U94914
	Bovine viral diarrhea virus 2 <i>isolate</i>	JN967713
vDVB tipo 3	Hobi/Brazil/315/2004 <i>strain</i>	EF683558.1
	Th/04_KhonKaen	DQ897641.1
	Bovine viral diarrhea virus 3 <i>isolate</i>	JN967747
vFPC	Classical swine fever virus isolate BRESCIAX	AY578687.1
vEF	Border disease virus strain X818	AF037405.1

Cuadro 5.6. Cepas de referencia utilizadas para el análisis filogenético

Las secuencias de nucleótidos fueron alineadas utilizando el programa ClustalW⁹² usando el software BioEdit⁹³. El análisis filogenético se llevó a cabo con el software MEGA versión 5.1⁹⁴ para el cual se consideraron los siguientes parámetros:

Como modelo de sustitución nucleotídica se utilizó el método Kimura de 2 parámetros⁹⁵, elegido con base en el valor obtenido por el criterio de información bayesiana el cual fue de 1820.72.

Como método de reconstrucción filogenética se utilizó el método de máxima verosimilitud. Adicionalmente se realizó la reconstrucción filogenética por el

método del *Neighbor-Joining*⁹⁶ obteniendo la misma topología. Finalmente como método de soporte estadístico se utilizaron 500 réplicas de bootstraps⁹⁷.

6. RESULTADOS

6.1 Determinación de la identidad de las cepas testigo

El cultivo celular infectado con la cepa testigo CP mostró vacuolización y muerte celular en el tiempo esperado (48 h). Se verificó la identidad de la cepa mediante una amplificación por la RT-PCR y secuenciación de un fragmento de 293pb correspondiente a la región 5'UTR (Figura 6.1). La identidad de la secuencia fue confirmada mediante comparación con la base de datos publicados en el *GenBank*, con el *National center for Biotechnology Information BLAST network server*⁹⁸ y se confirmó que la cepa testigo corresponde al vDVB tipo 1 cepa NADL (CP).

Con base en estos análisis, el ARN y el producto amplificado de la cepa NADL se usó como testigo positivo en cada RT-PCR de las muestras utilizadas.

Como testigo negativo de la prueba de RT-PCR se utilizó el ARN de células MDBK sin infectar.

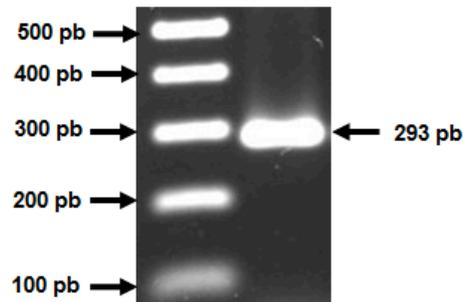


Figura 6.1 Producto de la RT-PCR para 5'UTR (Cepa referencia). Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con GelRed®, donde se muestra la amplificación de la región 5'UTR del vDVB. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb Plus, carril 2: Cepa referencia vDVB NADL.

6.2 Amplificación del fragmento de la región 5'UTR en muestras de trabajo

Los resultados obtenidos con las muestras procesadas fueron los siguientes:

De las 6 vacunas (de la G a la L) que no contenían al vDVB como agente vacunal se obtuvieron 4 positivas (G, H, I y K) y 2 negativas (J y L). (Figura 6.2) con un producto amplificado de 293 pb correspondiente a la región 5'UTR.

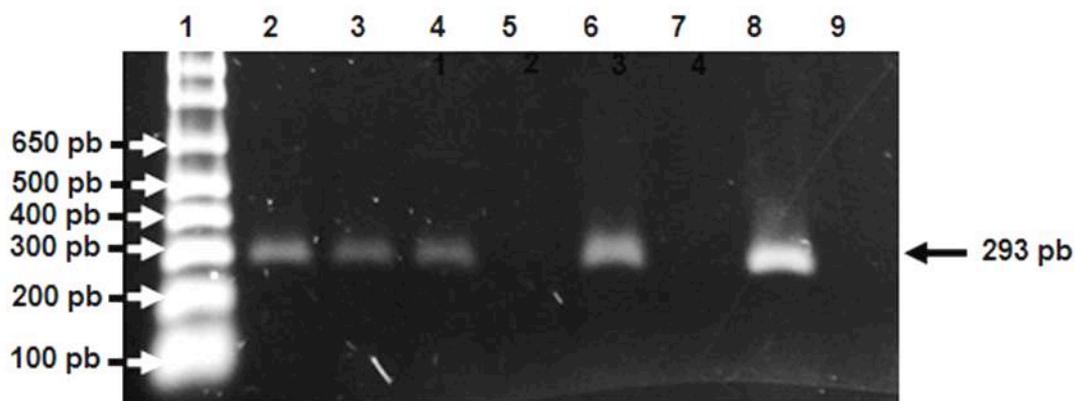


Figura 6.2 Producto de la RT-PCR para 5'UTR (vacunas). Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con GelRed®, donde se muestra la amplificación de la región 5'UTR del vDVB. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb Plus, carril 2: vacuna G, carril 3: vacuna H, carril 4: vacuna I, carril 5: vacuna J, carril 6: vacuna K, carril 7: vacuna L, carril 8: testigo positivo, carril 9: testigo negativo.

En las muestras de SFB se obtuvieron 8 positivas y 2 negativas. (Figura 6.3)

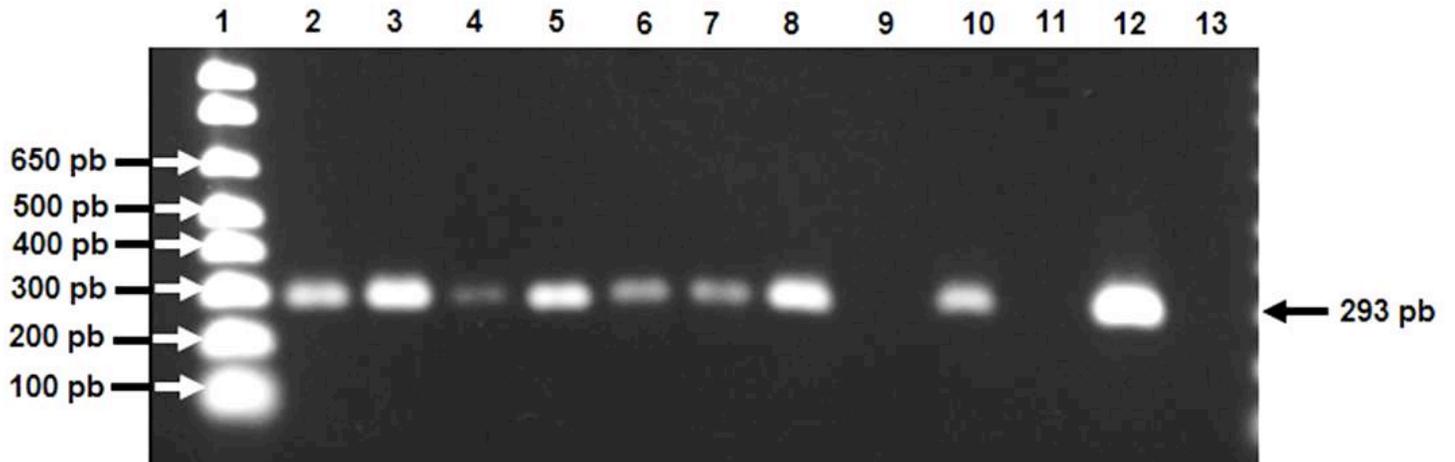


Figura 6.3 Producto de la RT-PCR para 5'UTR (SFB). Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con GelRed®, donde se muestra la amplificación de la región 5'UTR del vDVB. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb Plus, carril 2: SFB 1, carril 3: SFB 2, carril 4: SFB 3, carril 5: SFB 4, carril 6: SFB 5, carril 7: SFB 6, carril 8: SFB 7, carril 9: SFB 8, carril 10: SFB 9, carril 11: SFB 10, carril 12: testigo positivo, carril 13: testigo negativo.

De las 8 líneas celulares procesadas se obtuvieron 7 muestras positivas y una negativa. Con el mismo producto de amplificación. (Figura 6.4)

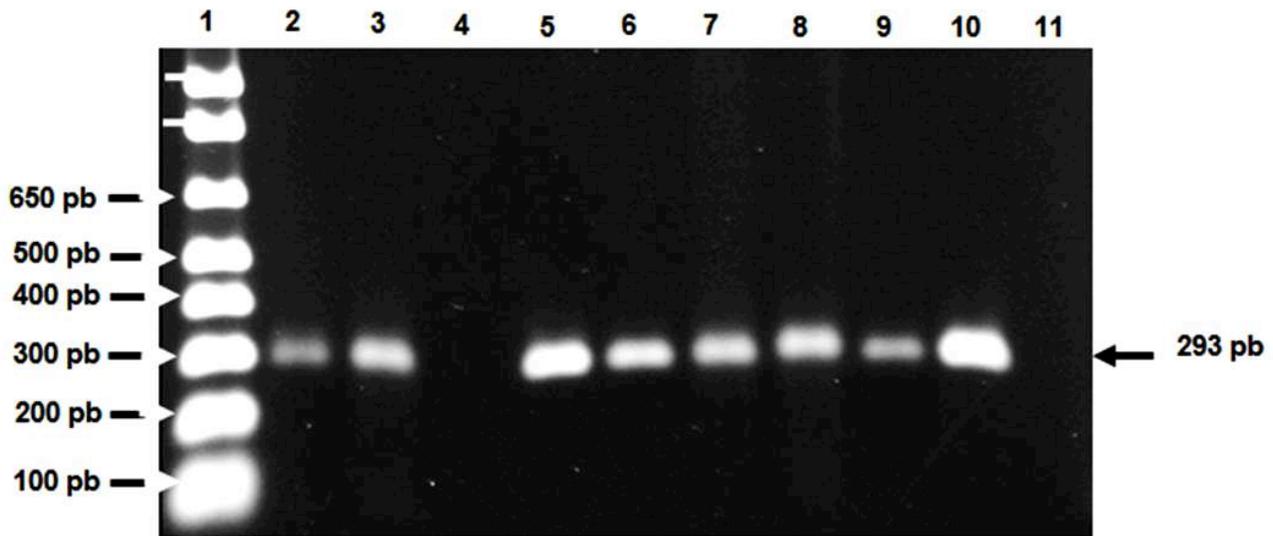


Figura 6.4 Producto de la RT-PCR para 5'UTR (líneas celulares). Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con GelRed®, donde se muestra la amplificación de la región 5'UTR del vDVB. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb Plus, carril 2: línea celular 1, carril 3: línea celular 2, carril 4: línea celular 3, carril 5: línea celular 4, carril 6: línea celular, carril 7: línea celular 6, carril 8: línea celular 7, carril 9: línea celular 8, carril 10: testigo positivo, carril 11: testigo negativo.

En las 6 vacunas (de la A a la F) que tenían como agente vacunal al vDVB se obtuvo un producto amplificado de 293 pb correspondiente a la región 5'UTR del vDVB. (Figura 6.5)

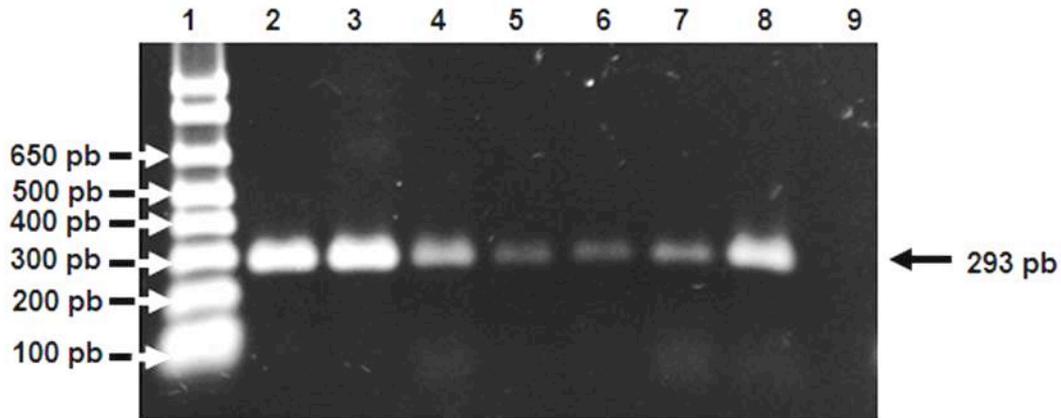


Figura 6.5 Producto de la RT-PCR para 5'UTR (vacunas). Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con GelRed®, donde se muestra la amplificación de la región 5'UTR del vDVB. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb Plus, carril 2: vacuna A, carril 3: vacuna B, carril 4: vacuna C, carril 5: vacuna D, carril 6: vacuna E, carril 7: vacuna F, carril 8: testigo positivo, carril 9: testigo negativo.

De un total de 25 muestras procesadas y que resultaron positivas a la PCR, se obtuvieron las secuencias de los productos amplificados. En seis vacunas indicadas para la inmunización contra DVB se estableció la identidad del vDVB como agente vacunal. De las 19 muestras restantes que debían estar libres de la presencia del genoma del vDVB, 12 fueron positivas para el vDVB tipo1b, 4 fueron positivas al vDVB tipo 1a y 3 al vDVB tipo 2. Es decir, en estas muestras se identificó a este virus como un agente contaminante.

6.2.1 Análisis filogenético del fragmento de la región 5'UTR

El árbol filogenético fue construido utilizando las secuencias obtenidas a partir de la amplificación del fragmento de la región 5'UTR específica del vDVB. (Figura 6.5) Las secuencias fueron registradas en el Genbank con los números de acceso del KC252579 al KC252597. (Anexo 2)

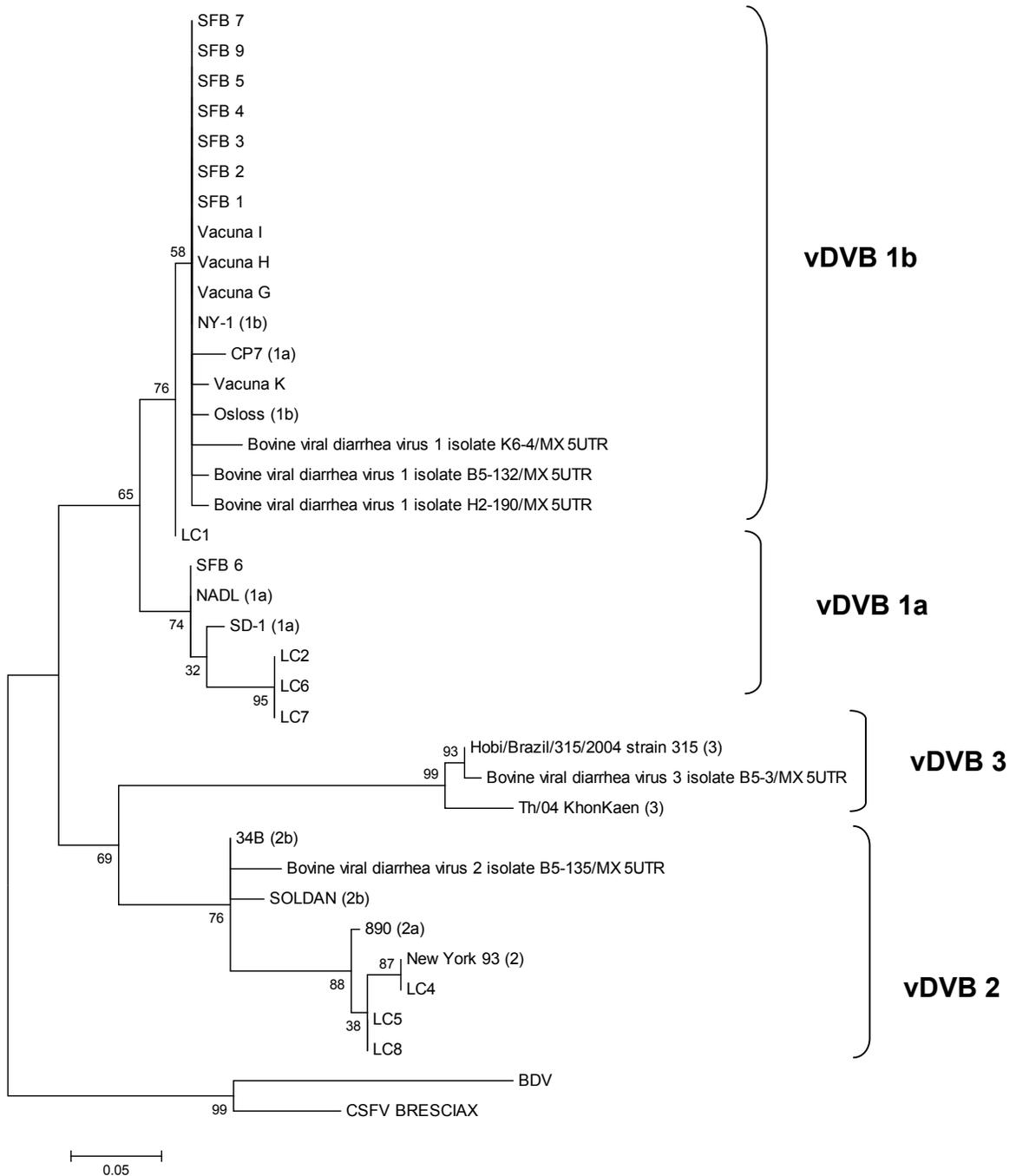


Figura 6.6 Análisis filogenético y clasificación del vDVB basados en un fragmento de 293pb de la región 5'UTR. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud utilizando un fragmento de 293 nucleótidos contenidos en la región no codificante 5'UTR. Se utilizaron las 19 secuencias obtenidas en este trabajo y 18 cepas de referencia obtenidas del *Genbank*. Las secuencias obtenidas se identificaron como tipo muestra: SFB (número), Vacuna (número) y LC (número).

El diagrama obtenido a partir del análisis filogenético realizado con las secuencias de los productos de PCR de las muestras positivas a la presencia del vDVB, son presentados en la figura 6.5. Las secuencias analizadas se agruparon en los clados correspondientes a los diferentes genotipos del virus de diarrea viral bovina, confirmando su identidad con las cepas contenidas en las muestras con este virus.

El programa utilizado para el análisis mostró que las secuencias procedentes de las vacunas I, G, H y los sueros fetales bovinos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, se agruparon en el cladograma correspondiente al genotipo 1b, que presenta una identidad del 100% con la cepa NY-1. La vacuna K presenta una identidad del 99.99% con la cepa NY-1. El producto de la PCR obtenido a partir de la línea celular 1 presenta una identidad del 99.99% con la cepa NY-1.

Los productos obtenidos del SFB 6, así como las líneas celulares 2, 6 y 7 se agruparon en el clado 1a. El SFB 6 presentó una identidad del 100% con las cepa de referencia NADL, mientras que las líneas celulares 2, 6 y 7 tienen una identidad del 99.95% con la cepa de referencia SD-1. Finalmente la línea celular 4 tuvo una identidad del 100% con la cepa New York 93 la cual pertenece al vDVB tipo 2a. Las líneas 5 y 8 se agruparon con el genotipo 2, presentando una identidad del 99.99% con la cepa de referencia 890.

De los tres tipos de muestras analizadas, las líneas celulares son las que mostraron identidad con un mayor número de cepas de referencia.

Lo anterior sugiere que, la contaminación de SFB y líneas celulares representa un riesgo importante en la producción de vacunas ya que por esta vía puede favorecer la propagación del virus y ocasionar brotes de la enfermedad^{87,88, 89, 90}.

	CP7	Osloss	NY-1	NADL	SD-1	890	NY-93
Vacuna G	99.9831%	99.991%	100%	99.948%	99.930%	99.827%	99.850%
Vacuna H	99.9831%	99.991%	100%	99.948%	99.930%	99.827%	99.850%
Vacuna I	99.9831%	99.991%	100%	99.948%	99.930%	99.827%	99.850%
Vacuna K	99.9745	99.983%	99.991%	99.939%	99.920%	99.816%	99.839%
SFB/ 1	99.9831%	99.991%	100%	99.948%	99.930%	99.827%	99.850%
SFB/ 2	99.9831%	99.991%	100%	99.948%	99.930%	99.827%	99.850%
SFB/ 3	99.9831%	99.991%	100%	99.948%	99.930%	99.827%	99.850%
SFB/ 4	99.9831%	99.991%	100%	99.948%	99.930%	99.827%	99.850%
SFB/ 5	99.9831%	99.991%	100%	99.948%	99.930%	99.827%	99.850%
SFB/ 6	99.9300%	99.939%	99.948%	100%	99.983%	99.805%	99.828%
SFB/ 7	99.9831%	99.991%	100%	99.948%	99.930%	99.827%	99.850%
SFB/ 9	99.9831%	99.991%	100%	99.948%	99.930%	99.827%	99.850%
Línea celular/ 1	99.9745%	99.983%	99.991%	99.957%	99.939%	99.816%	99.839%
Línea celular/ 2	99.910%	99.920%	99.930%	99.956%	99.957%	99.781%	99.805%
Línea celular/ 4	99.8278%	99.983%	99.850%	99.928%	99.806%	99.974%	100%
Línea celular/ 5	99.8042%	99.816%	99.827%	99.805%	99.794%	99.991%	99.983%
Línea celular/ 6	99.9109%	99.920%	99.930%	99.956%	99.957%	99.781%	99.805%
Línea celular/ 7	99.910%	99.920%	99.930%	99.956%	99.957%	99.781%	99.805%
Línea celular/ 8	99.8042%	99.816%	99.827%	99.805%	99.794%	99.991%	99.983%

Cuadro 6.1 Porcentajes de identidad. Porcentajes de identidad de las muestras procesadas comparadas con las cepas de referencia CP7, Osloss, NY-1, NADL, SD-1, 890 y NY-93. Los números en negritas representan los valores con el mayor porcentaje de identidad.

7. DISCUSIÓN

En México se desconoce la situación epidemiológica actual de la DVB. Existen algunos estudios en nuestro país que revelan la presencia de anticuerpos contra este virus al que refieren como uno de los causantes de infertilidad en el ganado⁹⁹, sin embargo, hasta ahora no existen reportes que revelen la presencia del virus en animales seronegativos, es decir los (PI). No obstante se ha determinado la seroprevalencia de la enfermedad en algunas regiones del país, por ejemplo: se ha encontrado que en el trópico húmedo mexicano llega a alcanzar el 12.27%⁹⁹; en el estado de Morelos se realizó un estudio que demostró que el 42% de los animales analizados fueron seropositivos¹⁰⁰ mientras que en el estado de Yucatán 14% fueron positivos al vDVB¹⁰¹ y en el norte de Chiapas el 35.1%¹⁰². Sin embargo, no existen trabajos en donde se haya determinado las variedades de vDVB que circula en el ganado de nuestro país.

La Comisión Nacional de Salud Animal (CONASA) considera a la enfermedad como endémica en el país, aunque no de riesgo epidemiológico, económico, de salud pública o de riesgo en el comercio nacional e internacional pero sí de notificación obligatoria¹⁰³.

Las pérdidas económicas a causa de una infección por el vDVB, por lo general son el resultado disminución en la producción láctea, defectos congénitos, desórdenes reproductivos, así como la predisposición a otras enfermedades entre otros. No obstante, es difícil evaluar el impacto económico de las infecciones causadas por el vDVB, únicamente con base en informes clínicos de los brotes de la enfermedad. Las pérdidas económicas relacionadas con este padecimiento se

deben a la disminución de la producción, así como por los gastos en tratamientos y para la prevención¹⁰⁴.

Las pérdidas en la producción dependen del tamaño de la población, incidencia de la infección y por supuesto la magnitud de las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad¹⁰⁵. Sin embargo, el cálculo de las pérdidas en los brotes de la DVB son significativamente variables, ya que el daño causado por la enfermedad es distinto de hato en hato, independientemente de la metodología empleada para calcular dichas pérdidas¹⁰⁶. Y si a esto le agregamos que en la mayoría de los casos las pérdidas calculadas sólo incluyen las causadas por los efectos directos como abortos y muerte animal, mientras que efectos indirectos como el incremento de riesgo de los animales de contraer otras enfermedades nos son incluidas, haciendo que el cálculo de las pérdidas sea aún más complicado¹⁰⁶.

Por otra parte, se han propuesto diferentes medidas para el control de la enfermedad. El programa de control de la enfermedad debe estar basado en una (1) bioseguridad estricta, (2) eliminación de animales PI, (3) un monitoreo permanente y (4) vacunación, la cual está recomendada como una herramienta suplementaria para reforzar la protección contra la infección o la reinfección. En un programa de control adecuado estos cuatro puntos deben ser aplicados de manera meticulosa y al mismo tiempo. Hay que tomar en cuenta que la detección de animales PI requiere de un esfuerzo continuo¹⁰⁷.

Como se mencionó con anterioridad la vacunación se utiliza como un método preventivo para la DVB. Sin embargo, los SFB y las líneas celulares utilizadas para la elaboración de vacunas tienen el riesgo de encontrarse contaminados con el vDVB y como consecuencia de dicha contaminación se han descrito brotes de

la enfermedad en bovinos por el uso de dichos productos^{108, 109}. Además, se ha reportado la infección con el vDVB proveniente de un lote de vacunas contaminadas utilizadas en cerdos¹¹⁰ y cabras¹¹¹. Por otro lado, en un estudio realizado en Italia por Falcone E. *et al* se pudo reproducir la DVB con una signología grave típica de la enfermedad, al inocular experimentalmente el vDVB tipo 2 aislado a partir de una vacuna comercial utilizada para la protección contra rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) en bovinos¹¹².

Por lo anterior que es muy importante verificar que los productos utilizados para la vacunación el ganado bovino se encuentren libres del vDVB.

En este trabajo se identificó la presencia del vDVB como contaminante en muestras de los diferentes productos procesados. Esto fue determinado por medio de RT-PCR y secuenciación. Así mismo la comparación de las secuencias de los productos amplificados de la región 5'UTR con diferentes cepas de referencia de vDVB reportados en el *GenBank* fue útil para determinar la identidad de las cepas. El uso de estas técnicas ha sido descrita previamente para determinar los genotipos e incluso los subgenotipos que están presentes en poblaciones ganaderas en diferentes países^{113, 114, 115, 116, 117,118,119}. De la misma manera en vacunas para el ser humano, se ha detectado la presencia del genoma del vDVB; esto en vacunas originarias de Suiza en donde el virus se caracterizó como vDVB tipo 1d¹²⁰, mientras que en vacunas originarias de Japón se caracterizaron los subgenotipos 1a y 1c¹²¹. En otro trabajo realizado en Italia se logró detectar el vDVB como contaminante en vacunas de uso en humanos por medio de RT-PCR y secuenciación, el estudio reveló que las muestras positivas al vDVB pertenecían a los subtipos 1a, 1b, 1c y 1d¹²².

En comparación con los hallazgos en el estudio de vacunas para humanos, en las vacunas de uso veterinario los trabajos que existen solo se identifica al vDVB como contaminante^{88, 90, 123, 124} sin caracterizar las variedades del vDVB que predomina en la muestras.

De las vacunas que se evaluaron en el presente trabajo, en las muestras identificadas como G, H, I y K (secuencias registradas con los números de acceso al *GenBank*: KC252579, KC252580, KC252581 y KC252582 respectivamente. Anexo 2) se detectó la presencia de vDVB del tipo 1b como agente contaminante. Estos resultados coinciden con lo encontrado en las vacunas de uso en humanos que han sido analizadas para la detección de vDVB.

La contaminación de vacunas con el vDVB se puede originar a partir del uso de lotes de SFB o líneas celulares contaminadas, como se ha establecido anteriormente. Por otra parte, si bien con el uso de la RT-PCR se puede detectar la presencia del ácido nucleico viral, no se puede determinar que el virus se encuentre activo.

Investigaciones realizadas por Levings y Wessman demostraron que la frecuencia de la detección vDVB o anticuerpos detectados en lotes de 1 litro de SFB de no más de 2 fetos, varía entre el 20% y el 87.1%, y la frecuencia en la detección del vDVB de mezclas de SFB ultracentrifugados varía entre el 20.8% y el 50%. Lo anterior sugiere que la frecuencia de la presencia del vDVB en el suero es alta y explica la probabilidad de contaminación de los cultivos celulares que son mantenidas con medio de cultivo adicionado con SFB¹²⁵. Se ha aislado vDVB de SFB, incluso con tratamientos con radiación gamma y filtración¹²⁶, por lo que se

puede decir que los métodos por los que se inactiva el SFB no siempre son aplicados efectivamente⁸².

En el presente trabajo el análisis de los fragmentos secuenciados de los amplificadores obtenidos en las muestras de SFB (secuencias registradas con los números de acceso al *GenBank*: del KC252583 al KC252590. Anexo 2), mostraron una alta identidad con los vDVB tipo 1a y 1b. Dichos resultados revelan la presencia de por lo menos 2 subgenotipos en los SFB comercializados en México. Estos resultados son similares a los obtenidos en trabajos en Polonia en donde se logró identificar al vDVB 1a, 1b y 1c aunque no pudieron ser aislados¹²⁷. De la misma manera, en Suiza se logró establecer la presencia del virus atípico de la DVB tipo 3 en sueros originarios de México y otros países como Brasil, Canadá y Australia¹²⁸.

En Estados Unidos de América existe evidencia que de un 20-50% de los lotes de SFB contienen vDVB infeccioso^{121, 129}, y se han identificado los subgenotipos 1a y 1b como los contaminantes de diferentes lotes¹²⁴. En distintas partes del mundo se ha detectado que el 57.1% de los SFB están contaminados con pestivirus de los cuales se ha logrado aislar vDVB tanto del tipo 1 como del tipo 2⁸⁴.

En este trabajo se detectó el vDVB en el 80% de las muestras procesadas, resultado que es similar a lo reportado por Zabal O. et al en el 2000¹³⁰.

Es por esto que el grado de pureza del SFB utilizado en la producción de vacunas, tiene un fuerte impacto en la calidad del producto terminado. Garantizar la calidad del suero empleado en la elaboración de estos productos resulta en la reducción de riesgos, para lograrlo existen tres elementos esenciales a controlar: el origen, las pruebas de detección del vDVB, y los procedimientos de inactivación aplicados

al SFB para eliminar o reducir cualquier contaminante potencial⁸². De estos tres elementos, el control del origen del SFB es el más importante; ya que la eliminación de la fuente de contaminación es el método más eficaz para asegurar la ausencia de virus en el SFB⁸².

Por otro lado, desde 1975 también se ha reconocido la contaminación de líneas celulares susceptibles a la infección por el vDVB al utilizar al SFB como suplemento en el medio de crecimiento¹³¹. Se ha informado que líneas celulares de origen bovino, de ovino, caprino, de ciervo, bisonte, hámster, conejo, mono, y gato doméstico; obtenidas del ATCC se encontraron contaminadas con el vDVB¹³². La consecuencia es que, en cultivos celulares en donde se quiere evaluar la replicación de un virus diferente al vDVB, se puede llegar a presentar el fenómeno de interferencia viral, causando un resultado indeseable de la prueba¹³³. Además la contaminación de líneas celulares con el vDVB puede provocar cambios en el crecimiento de las células¹³⁴.

En las líneas celulares que fueron procesadas como parte de este trabajo, se encontró vDVB del tipo 1a y del tipo 2 (secuencias registradas con los números de acceso al *GenBank*: del KC252591 al KC252597. Anexo 2).

Algo muy importante a considerar es que las vacunas y los SFB's que se analizaron en este estudio están disponibles en el mercado. En el caso de las líneas celulares, algunas provenían de laboratorios productores de vacunas y resultaron positivas a la presencia de ácidos nucleicos del vDVB. De los tres grupos de muestras analizadas, las líneas celulares son las que mostraron identidad con un mayor número de cepas de referencia.

Existe normatividad tanto nacional como internacional, que establece que en el control de calidad de vacunas se requiere descartar la presencia de agentes biológicos contaminantes, incluyendo a los pestivirus¹³⁵, de la misma manera que en los SFB y líneas celulares de origen animal que se utilizan para su elaboración; esto con el propósito de garantizar la pureza del producto terminado^{136, 137}. Para la identificación del vDVB en los productos previamente mencionados se han propuesto diversas técnicas de diagnóstico como la RT-PCR¹³⁸. La RT-PCR es una prueba altamente sensible y específica que se utiliza cuando se sospecha de contaminación por el vDVB¹³⁹. El manual de la OIE sugiere el uso de iniciadores que amplifiquen regiones conservadas como la región 5'UTR o NS3¹³³; por lo cual se ha propuesto como una alternativa de solución, para detectar los distintos vDVB que sabemos pueden estar presentes en SFB, líneas celulares y vacunas¹²⁹.

La RT-PCR y secuenciación son herramientas útiles para determinar la identidad de una cepa vacunal. En el caso de las muestras procesadas de vacunas que contenían el vDVB como antígeno vacunal (A-F), la RT-PCR permitió su identificación misma que se confirmó con el análisis de las secuencias.

Hasta el momento no existen informes en México de brotes causados por vacunas contaminadas, así mismo, tampoco hay información disponible acerca de la identificación de virus contaminantes en productos terminados. Motivo por el cual es recomendable la realización de pruebas de rutina en forma continúa para determinar la posible contaminación en los productos evitando así que queden disponibles en el mercado.

8. CONCLUSIONES

- I. Se estandarizó una técnica de RT-PCR para detectar el vDVB amplificando un fragmento de la región 5`UTR.
- II. Se encontró evidencia de la presencia de ácidos nucleicos del virus de la diarrea viral bovina como contaminante en vacunas de uso veterinario, así como en SFB y líneas celulares. Sin embargo, no se demostró actividad biológica.
- III. Con base en el análisis de secuencias se demostró que los virus identificados como contaminantes en las vacunas, SFB y líneas celulares corresponden al vDVB tipo1 y al tipo 2.
- IV. Se determinó la identidad de las cepas en las vacunas que tenían el vDVB como agente vacunal.

9. PROSPECTIVA

- Determinar las causas por las cuales no fue posible amplificar la región que codifica para la síntesis de la proteína NS3.
- Se propone el aislamiento del virus de las vacunas, SFB y líneas celulares para determinar la infectividad del virus.
- Se sugiere incluir la realización de RT-PCR y secuenciación en los procedimientos de control de calidad para detectar contaminación con el vDVB en materia prima y vacunas comerciales y reducir el

riesgo de diseminación de esta enfermedad en los animales de abasto.

- Hacer un estudio de epidemiología molecular para identificar las variantes genéticas del vDVB que están presentes como contaminantes en vacunas, virus semilla, SFB y líneas celulares; y establecer la relación que existe con las cepas que circulan en el ganado en México.

Anexo 1. Medios de cultivo y soluciones

Medio para cultivo celular

Reactivo	Cantidad
Opti-MEM (Gibco)	13.6 g
Suero equino (ATCC)	10ml
Caldo triptosa fosfato (DIFCO)	10ml
Antibiótico penicilina-estreptomicina (Gibco)	1ml
Agua Mili-Q	c.b.p. 1000 ml

Disolver los 13.6 g del medio en polvo en c.b.p. 1 litro de agua Mili-Q y esterilizar por medio de filtración. Conservar en refrigeración.

Caldo triptosa fosfato (TPB)

Reactivo	Cantidad
Caldo triptosa fosfato	29.5 g
Agua desionizada	1000ml

Disuelva el caldo en polvo en 1 litro de agua desionizada. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C a 20 libras de presión. Conservar en refrigeración.

Solución TAE 50x pH 8.5

Reactivo	Cantidad
Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.2 g

Aforar con agua desionizada a 1 litro.
Solución de trabajo 1x

Reactivo	Cantidad
Tris acetato	40mM
EDTA	2mM

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se elabora a base de dos soluciones: Solución A Fosfato de sodio monobásico, Solución B Fosfato de sodio dibásico.

Solución A Fosfato de sodio monobásico al 0.15M pH 4.5	
Reactivo	Cantidad
Sodio monobásico NaH ₂ PO ₄	
Cloruro de Sodio NaCl	8.5 g
Agua destilada	1000ml

Solución B Fosfato de sodio dibásico al 0.15M pH 8.7	
Reactivo	Cantidad
Sodio dibásico Na ₂ HPO ₄	

Cloruro de Sodio NaCl	8.5 g
Agua destilada	1000ml

Preparar las soluciones A y B por separado. Mezclar las soluciones en la siguiente proporción 1:4

- Solución A (ácida) 1 parte
- Solución B (básico) 4 partes

Regulador de muestra (20µl)

Reactivo	Cantidad
Tris HCl pH 8 1M	4.8µl
EDTA pH 8	960 µl
Glicerol estéril 70%	1.7 µl
Azul de bromofenol estéril	1.2 µl
Agua destilada estéril	11.3 µl

Mezclar los componentes y distribuir en viales de 1ml.

Agua con DEPC

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	100ml
DEPC	100µl

Dejar en agitación con bala magnética toda la noche a temperatura ambiente. Esterilizar con autoclave para inactivar DEPC.

Anexo 2. Secuencias

Tipo de muestra/ Identificación	Secuencia	No. de acceso al <i>GenBank</i>
Vacuna G	GGGTAGCACANTGGTGGAGTTCGTTGGATGGCTGAAGCCCTGAGTACA GGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCTTTGGAGGACAAGCCTCGAGATG CCACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGGACGGGG GTCGTTCAGGnGAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGAATACAGCCTG ATAGGGTGCTGCAGAGGCCACTGTATTGCTACTNAAAATCTCTGCT GTACATGGNACATGGAGTTGG	KC252579
Vacuna H	GTgAGTTCGTTGGATGGCTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAG TGGTTCGACGCTTTGGAGGACAAGCCTCGAGATGCCACGTGGACGAG GGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGGACGGGGTTCGTTTCAGGTGA AAACGGTTTAACCAACCGCTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCA GAGGCCACTGTATTGCTACTnAAAATCTCTGCTGTACATGGCACAT GGAGTTGG	KC252580
Vacuna I	AGCANCTNNNNGTGAGTTCGTTGGATGGCTGAAGCCCTGAGTACAGG GTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCTTTGGAGGACAAGCCTCGAGATGCC ACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGGACGGGGGT CGTTTCAGGTGAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGAATACAGCCTGAT AGGGTGCTGCAAAGGCCACTGTATTGCTACTnAAAATCTCTGCTGT ACATGGCACATGGAGTTGG	KC252581
Vacuna K	GGGGNNTAGCANNNTGGTGGAGTTCGTTGGATGGCTGAAGCCCTGAGT ACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCTTTGGAGGACAAGNNTCNAN ATGNCNCGTGGACGAGGNNTGCCNCNGCACATCTTANNCTGGACG GGGGTCGTTGNGGAAAACGGTTTAANNANCGNTACNAATACNNC CTGANANGNGNTGCNNANNCCNNTGTATTGCTACNAAAATCTCT GCTGTACATGGNCCATGGAGTTGG	KC252582
SFB1	GTGAGNTTCGTTGGATGGCNTGAANCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTC AGTGGTTCGACNCCTNTTGGANGACAAGNCTCGAGATGCCNCGTGGGA CGANGGCATGCCNCANCACATCTTANNCTGGNCGGGGGTTCGTTTCAG GTGAAAACGGTTTNANNNACCGCTNCAAAATACAGCCTGATAGGGTGC TGACANNCCCCCTGTATTGCTACTAAAANTCTCTGCTGGACNTGGN NCATGGANTTGGNA	KC252583
SFB 2	GGGGGTAGCANCAGTGGTGAgTTCGTTGGATGGCTGAAGCCCTGAGT ACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCTTCGGAGGACAAGCCTCGAG ATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGGNCG GGGGTCGCTCAGGTGAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGnATACAGC CTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCACTGTATTGCTACTnAaAATCTCT GCTGTACATGGCACATGGAGTTG	KC252584

SFB 3	tANNGGGGTAGCAGCAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGnTGAAGCCCT GAGTACAGGGTAGTCGTTCAGTGGTTCGACGCTTCGGAGGACAAGCCT CGAGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAnCACATCTTAACCTG nNCGGGGTTCGCTCAGGTGAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGnNTA CAGCCTGATAGGGTGCAGAGGCCCACTGTATTGCTACTnAAAAAT CTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGA	KC252585
SFB 4	GGGGGTAGCACAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGCTGAAGCCCTGAGTA CAGGGTAGTCGTTCAGTGGTTCGACGCTTTGGAGGACAAGCCTCGAGA TGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGGACGG GGGTCGTTTCAGGTGAAAACGGTTTAACCAACCGCTACnAATACAGCC TGATAGGGTGCAGAnAGGCCCACTGTATTGCTACTAAAAATCTCTG CTGTACATGGCACATGGAGTTG	KC252586
SFB 5	GGGGGTAGCacAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGATGAAGCCCTGAGTA CAGGGTAGTCGTTCAGTGGTTCGACGCTTCNGAAGACAAGCCTCGAGA TGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACATCACATCTTAACCTGAACGG GGGTCGNTCAGGTGAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGAATACAGCC TGATAGGGTGCAGAAAGGCCCACTGTATTG	KC252587
SFB 6	GTAGCAnCAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGCTTAAGCCCTGAGTACAG GGTAGTCGTTCAGTGGTTCGACGCTTTGGAATAAAGGTCTCGAGATGC CACGTGGACGAGGGCATGCCCAAAGCACATCTTAACCTGAGCGGGGG TCGCCCAGGTAAAAAnCAGTTTTAACCGACTGTTACGAATACAGCCTG ATAGGGTGCAGAAAGGCCCACTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCT GTACATGGCACATGGAGTT	KC252588
SFB 7	GGGTAGCACAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGCTNGAAGCCCTGAGTA CAGGGTAGTCGTTCAGTGGTTCGACGCTTTGGAGGACAAGCCTCGAGA TGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGGACGG GGGTCGTTTCAGGTGAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGAATACAGCC TGATAGGGTGCAGAGGCCCACTGTATTGCTACTnAAAAATCTCTG CTGTACATGGCACATGGAGTTGA	KC252589
SFB 9	GGGGGTAGCACaGnGGTGAGTTCGTTGGATGGCTGAAGCCCTGAGT ACAGGGTAGTCGTTCAGTGGTTCGACGCTTTGGAGGACAAGCCTCGAG ATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGGACG GGGGTCGTTTCAGGTGAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGAATACAGC CTGATAGGGTGCAGAGGCCCACTGTATTGCTACTnAAAAATCTCT GCTGTACATGGCACATGGAGTTG	KC252590
Línea celular 1	CACNNNNGGTGAGTTCCTGGANGGCNTNAACCCTGAGTACAGGGTAG TCGTCAGTGGTTCGACNNNNTGNANNACAAGTCTCNNNATGCCNCGT GGACGANGNNNTGCCNCAGCACATCTTANNCTGATCGGGGGTTCGTT CANGTGAAAACAGTTTTNNTNACCGCTACNAATACAGCCTGATAGGG TGCTGCANANNCCNCTGTATTGCTNCTAAAAATCTCTGCTGGACCT	KC2525891

	GGCACATGGAGTTGGNN	
Línea celular/ 2	GNNNNGTANCACAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGCTTAagCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCCTTAACATGAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGGCACGCCCAAAGCACATCTTAACCCGAGCGGGGTCGCTCGGACGAAAACAGTTTGATCAACTGCTACAAATACAGCCTGATAGGNAGCTGCNaGGCCCACTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGAAATTGN	KC252592
Línea celular/ 4	GGAGGGGACTAGCGGTAGCAGTGAGTTCGTTGGATGGCCGAACCCCTGAGTACAGGGGAGTCGTCAATGGTTCGACACTCCATTAGTCGAGGAGTCTCGAGATGCCATGTGGACGAGGGCATGCCACGGCACATCTTAACCCATGCGGGGGTTGCATGGGTGAAAGCGCTATTCTGGCGTTATGGACACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAGACCTGCTATTCCGCTAGTAAAAAACTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTT	KC252593
Línea celular/ 5	gGGGACTAGCGGTAGCAGTGAGTTCATTGGATGGCCGAACCCCTGAGTACAGGGGAGTCGTCAATGGTTCGACACTCCTCTGGTCGAGGAGTCTCGAGATGCCATGTGGACGAGGGCATGCCACGGCACATCTTAACCCAACGCGGGGGTTGCATGGGTGAAAGCGCCATTCTGGCGTCATGGACACAGCCTGATAGGGTGTGGCAGAGACCTGCTACTCCGCTAGTAAAAACTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTT	KC252594
Línea celular/ 6	GNGGGGGTAGCACAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGCTTAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCCTTAACATGAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGGCACGCCCAAAGCACATCTTAACCCGAGCGGGGGTCGCTCGGACnAAAACAGTTTGATCAACTGCTACnAATACAGCCTGATAGGGTGTGCAGAGGCCCACTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGA	KC252595
Línea celular/ 7	GTAGNACNGTNGTGAgTTCGTTGGATGGCTTAAGCCCTGAGTACaGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCCTTAACATGAAGGTCTCGAGATGCACAGTGGACGAGGGCACGCCCAAAGCACATCTTAACCCGAGCGGGGGTCGCTCGGACGAAAACAGTTTGATCAACTGCTACGAATACAGCCTGATAGGGTGTGCAnAGGCCCACTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGA	KC252596
Línea celular/ 8	GNgGGGACTAGCGGTAGCAGTGAGTTCATTGGATGGCCGAACCCCTGAGTACAGGGGAGTCGTCAATGGTTCGACACTCCTCTGGTCGAGGAGTCTCGAGATGCCATGTGGACGAGGGCATGCCACGGCACATCTTAACCACGCGGGGGTTGCATGGGTGAAAGCGCCATTCTGGCGTCATGGACACAGCCTGATAGGGTGTGGCAGAGACCTGCTACTCCGCTAGTAAAAAACTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTT	KC252597

REFERENCIAS

- ¹ Olafson P, MacCallum AD, Fox A. "An apparently new transmissible disease of cattle." *Cornell Vet* 1946; 36: 205-213.
- ² Childs, T. "X disease in cattle - Saskatchewan." *Can J Comp Med* 1946; 10:316-319.
- ³ Fox FH: 1996, Historic clinical perspective. *Int Symp Bovine Viral Diarrhea Virus: A 50 Year Review June 23–25*. Ithaca, New York, pp. 1–4. Citado por: Sagar M. Goyal, Julia F. Ridpath: Books. 2005. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control*.
- ⁴ Houe H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North America: Food Animal Practice* 1995; 11: 521-547. Citado por: Peterhans E., Bachofen C., Stalder H., Schweizer M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestivirus doomed to extinction. *Vet Res* 2010; 41:44.
- ⁵ Peterhans E., Bachofen C., Stalder H., Schweizer M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestivirus doomed to extinction. *Vet Res* 2010; 41:44.
- ⁶ Pritchard G, Borland ED, Wood L, Pritchard DG. Severe disease in a dairy herd associated with acute infection with bovine virus diarrhoea virus, *Leptospira hardjo* and *Coxiella burnetii*. *Vet Rec* 1989; 124:625–9.
- ⁷ Houe H., Lloyd J.W., Baker J.C. Decision tree analysis of control strategies in Danish dairy herds with outbreaks of mucosal disease. *Prev Vet Med* 1994; 21:133–46.
- ⁸ Wentink GH, Dijkhuizen AA. Economische gevolgen van een infectie met het Bovine Virus Diarree virus (BVD-virus) op 14 melkveebedrijven. *Tijdschr Diergeneesk* 1990; 115:1031–40.
- ⁹ Duffel SJ, Sharp MW, Bates D. Financial loss resulting from BVD-MD virus infection in a dairy herd. *Vet Rec* 1986; 118:38–9. Houe H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1995; 11:521–48.
- ¹⁰ Bennett RM, Christiansen K, Clifton-Hadley RS. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. *Journal of Dairy Research* 1999; 66:455–9. Citado por: Houe Hans. Economic impact BVDV infection en dairies. *Biologicals* 2003; 31: 137-143.
- ¹¹ Houe H, Pedersen KM, Meyling A. A computerized spread sheet model for calculating total annual national losses due to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infection in dairy herds and sensitivity analysis of selected parameters. In: Edwards S (editor), *Proceedings of the Second Symposium on ruminant pestiviruses, Annecy, France 1st–3rd October 1992*; 179–184. Citado por: Houe Hans. Economic impact BVDV infection en dairies. *Biologicals* 2003; 31: 137-143.
- ¹² Heuer C., Healy A. and Zerbini C. Economic Effects of Exposure to Bovine Viral Diarrhoea Virus on Dairy Herds in New Zealand. *Journal of Dairy Science* 2007; 90: Issue 12, 5428-5438.
- ¹³ Bovine Viral Diarrhoea Virus. Veterinary services Centers for Epidemiology and Animal Health. 2007. United States Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS).
- ¹⁴ Rumenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H., Thiel, H. J. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol* 1993; 67: 3288–3294.

-
- ¹⁵ Xu, J., E. Mendez, P. R. Caron, C. Lin, M. A. Murcko, M. S. Collett, and C. M. Rice. 1997. Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* 71:5312–5322.
- ¹⁶ Andrew M. Q. King, Michael J Adams, Eric B Cartens and Elliot J Lefkowitz. *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* International union of microbiology societies. Virology Division. Elsevier, 2012; 1011-1014.
- ¹⁷ Ridpath Julia. *The Contribution of Infections with Bovine Viral Diarrhoea Viruses to Bovine Respiratory Disease.* Veterinary Clinic of North America. Food Animal Practice. Elsevier. 2010; 26: (2) 335-348.
- ¹⁸ Nettleton PF, Entrican G. Ruminant Pestiviruses. *Br. Vet. J.* 1995; 151: 615–642.
- ¹⁹ Ridpath J.F., Bolin S.R., The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* 1995; 212 (1):39-46
- ²⁰ Ridpath J.F., Bolin S.R., Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus , BD31, to other Pestivirus. *Virus Res* 1997; 50 (2):145-51
- ²¹ Lihong Liu, Hongyan Xia, Niklas Wahlberg, Sándor Belák, Claudia Baule. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology* 385 (2009) 351–357
- ²² Donis RO. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Food Anim. Pract.* 1995; 11: 393–423.
- ²³ J.F. Ridpath, S. R. Bolin, E. J. Dubovi. Segregation of Bovine Viral Diarrhoea into Genotypes. *Virology* 1994; 205: 66-74.
- ²⁴ Charles Pellerin, Jan Van Den Hurk, Jaqueline Lecomte, Peter Tijssen. Identification of Bovine Viral Diarrhoea Virus Strains Associates with Severe Outbreaks and High Mortalities. *Virology* 1994; 203: 206-268.
- ²⁵ Brownlie J., Thompson I., and Curwen A. Bovine virus Diarrhoea virus- strategic decisions for diagnosis and control. In *Practice*, 2000; 176-187.
- ²⁶ Vilcek, S., Paton, D.J., D'urkovic, B., Strojny, L., Ibata, G., Moussa, A., Loitsch, A., Rossmanith, W., Vega, S., Scicluna, M.T., Paifi, V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 2001; 146: 99–115.
- ²⁷ Vilcek, S., D'urkovic, B., Kolesarova, M., Greiser-Wilke, I., Paton, D. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet. Res.* 2004; 35: 609–615.
- ²⁸ Xu, X., Zhang, Q., Yu, X., Liang, L., Xiao, C., Xiang, H., Tu, C. Sequencing and comparative analysis of a pig bovine viral diarrhoea virus genome. *Virus Res.* 2006; 122: 164–170.
- ²⁹ Paton DJ. 1995. Pestivirus Diversity. *J. Comp. Path.* 1995 112: 215–236.

-
- ³⁰ Iang Rondón. Diarrea Viral Bovina: Patogénesis e inmunopatología. Rev. MVZ Córdoba 2006; 11 (1):694-704
- ³¹ Thiel, H.-J., Plagemann, P.G.W., Moennig, V. (1996) Pestiviruses. In: Fields, B.N. (Ed.), Virology, 3rd Edition. Raven, Philadelphia, PA, pp. 1059±1074.
- ³² Lértora, W.J. Diarrea viral bovina: actualización. Rev. Vet. 2003; 14 (1): 42-51
- ³³ Alexander V., Birk A.C., Edward J., Dubovi , Leona Cohen-Gould , Ruben Donis , Hazel. H. Szeto. Cytoplasmic vacuolization responses to cytopathic bovine viral diarrhoea virus. Virus Research 2008; 132: 76–85
- ³⁴ Dubovi E.J. Genetic diversity and BVD virus. Comp. Immun. Microbiol Infec Dis 1992; 15:155–62.
- ³⁵ Kirkland P, McGowan M, Mackintosh S. Factors influencing the development of persistent infection in cattle with Pestivirus. In: Proceedings of the second symposium on pestiviruses; 1993; P. 117-21. Citado por: Grooms I. Daniel. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. Theriogenology 2006; 66: 624-628.
- ³⁶ BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. Vet. Clin. North Am.1995; 11 (3):425-445. Citado por: Grooms I. Daniel. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. Theriogenology 2006; 66: 624-628.
- ³⁷ Bolin SR, Ridpath JF. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. Am J Vet Res 1992; 53: 2157-2163. Citado por: Deregt D, Loewen KG. Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. Can. Vet. J. 1995; 36: 371–377.
- ³⁸ Becher P, Thiel HJ, Collins M, Brownlie J, Orlich M. Cellular Sequences in Pestivirus Genomes Encoding Gamma-Aminobutyric Acid (A) Receptor-Associated Protein an Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16 Kilodaltons. J Virol. 2002; 76.24: 13069-13076.
- ³⁹ V.L. Quadros, S.V. Mayer, F.S.F. Vogel, R. Weiblen, M.C.S. Brum, S. Arenhart and E.F. Flores. A search for RNA insertions and NS3 gene duplication in the genome of cytopathic isolates of bovine viral diarrhoea virus. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2006; 39: 935-944.
- ⁴⁰ Meyers G, Tautz N, Dubovi EJ, Thiel HJ. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. Virology 1991; 180: 602-616.
- ⁴¹ Meyers G, Stoll D, Gunn M. Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B in a Pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle. J Virol 1998; 72: 4139-4148.
- ⁴² Beate M. KuÈmmerera, Norbert Tautzb, Paul Becherb, Heinz-JuÈrgen Thielb, Gregor Meyers. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. Veterinary Microbiology 2000; 77: 117±128.
- ⁴³ Meyers G, Tautz N, Stark R, Brownlie J, Dubovi EJ, Collett MS, et al. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. Virology 1992; 191: 368-386.
- ⁴⁴ Tautz N, Thiel HJ, Dubovi EJ, Meyers G. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. J Virol 1994; 68: 3289-3297.
- ⁴⁵ Kummerer BM, Stoll D, Meyers G. Bovine viral diarrhoea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. J Virol 1998; 72: 4127-4138.

-
- ⁴⁶ Qi F, Ridpath JF, Lewis T, Bolin SR, Berry ES. Analysis of the bovine viral diarrhea virus genome for possible cellular insertions. *Virology* 1992; 189: 285-292.
- ⁴⁷ Lambot M, Douart A, Joris E, Letesson J, Pastoret P. Characterization of immune response of cattle against noncytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhea virus. *J Gen Virol* 1997; 78: 1041-1047.
- ⁴⁸ Rinck G., Birghan C., Harada T., Meyers G., Thiel H. J., and Tautz N. A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J. Virol.* 2001; 75: 9470–9482.
- ⁴⁹ Flint, S.J., Enquist L. W., Krug R.M., Racaniello V. R., Skalka A.M. Principles of virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. 2000; p 192.
- ⁵⁰ Lértora, J.; Paredes, E.; Reinhardt, G. y Alberdi, A.. Inmunohistoquímica en biopsias de piel tratadas con proteína K y microondas para el diagnóstico en animales persistentemente infectados con el virus diarreico viral bovino. *Arch. med. vet.* 2003; 35 (1): 23-36. Citado por: Morales Cauti, Siever Miguel. Detección de terneros con infección congénita con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos lecheros de la provincia de Arequipa. 2001.
- ⁵¹ Bielefeldt-Ohmann H. Pathogenesis of bovine viral diarrhoea–mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. *Res Vet Sci* 1983; 34: 5–10. Hewicker-Trautwein M, Trautwein G, Frey H-R, Liess B. Immunohistochemical studies of organ tropism of different biotypes of BVD virus in experimentally infected sheep fetuses. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1997; 104: 436–439.
- ⁵² IQBAL, M.; FLICK SMITH, H.; MC. CAULEY, J.W. 2000. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. *J. Gen. Virol.*, 81: 451-459.
- ⁵³ XUE, W.; BLECHA, F.; MINOCHA, H.C. 1990. Antigenic Variations in Bovine Viral Diarrhea Viruses Detected by Monoclonal Antibodies. *J. Clin. Microb.*, 28, 8: 1688-1693.
- ⁵⁴ Maurer K.; Krey T.; Moennig V.; Thiel H. J.; Rumenapf T. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* 78: 1792–1799; 2004.
- ⁵⁵ Krey, T., A. Himmelreich, M. Heimann, C. Menge, H.-J. Thiel, K. Maurer, and T. Rumenapf. 2006. Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1. *J. Virol.* 80:3912–3922
- ⁵⁶ Lecot S.; Belouzard S.; Dubuisson J.; Rouille Y. Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 79: 10826–10829; 2005.
- ⁵⁷ Sagar M. Goyal, Julia F. Ridpath: Books. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control.* 2008
- ⁵⁸ Purchio, A.F.; Larson, R.; Collet, M.S. A Characterization of Bovine Viral diarrhea virus proteins. *J. Virol.* 1984; 50: 666-669.
- ⁵⁹ Modificado de Moradpour D. et al. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5:453-463.

-
- ⁶⁰ Brusckke CJ, Weerdmeester K, van Oirschot JT, van Rijn PA: 1998a Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet Microbiol* 64:23–32.
- ⁶¹ Brusckke, C. J., Haghparast, A., Hoek, A., Rutten, V. P., Wentink, G. H., van Rijn, P. A. & van Oirschot, J. T. The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semihomologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 62: 37-50.
- ⁶² Ramírez G, Vera V, Villamil L. Diarrea viral bovina-DVB inmunosupresión y efectos en la reproducción bovina. *El Cebú* 1999. 32-40.
- ⁶³ Baker J. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin. North Amer* 1995; 11: 425-445.
- ⁶⁴ Frederick A. Murphy, E. Paul J. Gibbs, Marian C. , Horzinek Michael J. Studdert . *VETERINARY VIROLOGY*. Third Edition.
- ⁶⁵ Radostis, O.M.; Littlejohns, I.R.. New concepts in the Pathogenesis, Diagnosis and Control of Diseases Caused by the Bovine Viral Diarrhea Virus. *Can.Vet. J.* 1988; 29: 513-528.
- ⁶⁶ Fulton, R. W., Purdy, C. W., Confer, A. W., Saliki, J. T., Loan, R. W., Briggs, R. E. & Burge, L. J. Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res* 2000; 64: 151-9.
- ⁶⁷ Kirkland P, McGowan M, Mackintosh S. Factors influencing the development of persistent infection in cattle with Pestivirus. In: Proceedings of the second symposium on pestiviruses. 1993; 117-21. Citado por: Grooms I. Daniel. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology* 2006; 66: 624-628.
- ⁶⁸ Ian R. Tizard. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Octava edición. ELSEVIERS. Pp 226-227.
- ⁶⁹ Bolin SR, Ridpath JF. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am J Vet Res* 1992; 53: 2157-2163.
- ⁷⁰ Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res Vet Sci* 1989; 46: 307-311. Citado por: Dereg D, Loewen KG. Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. *Can. Vet. J.* 1995; 36: 371–377.
- ⁷¹ McClurkin A.W., Littledike E.T., Cutlip R.C., Frank G.H., Coria M.F. Bolin SR. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. *Can J Comp Med* 1984; 48: 156-161.
- ⁷² Roeder PL, Harkness JW. BVD virus infection: Prospects for control. *Vet Rec* 1986; 118: 143-147.
- ⁷³ Potgieter L.N.D: Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: *Infectious Diseases of Livestock*. eds. Coetzer JAW, Tustin RC, 2nd ed., vol. 2, pp. 946- 963. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 2004.

-
- ⁷⁴ Ridpath J., Neill, J. D.; Vilcek, S.; Dubovi, E.; Carman, S. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet. Microb.* 2006; 114: 196-204.
- ⁷⁵ Bolin SR, Ridpath JF. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.* 1992; 53: 2157–2163. Pernthaner A, Schilcher F, Baumgartner W.. Acute bovine viral diarrhea virus infections in Austrian cattle. *Israel J. Vet. Med.* 1997; 52: 104–107.
- ⁷⁶ Ridpath JF, Neill JD, Frey M, Landgraf JG. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Veterinary Microbiology* 2000; 77: 145-155.
- ⁷⁷ Baker JC. Bovine viral diarrhea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 190: 1449-1458. Radostits OM, Littlejohns IR. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus. *Can Vet J* 1988; 29: 513-528.
- ⁷⁸ Vera V. Genética molecular del virus de la diarrea viral bovina. *Memorias: Aspectos básicos de la fisiología reproductiva y perspectivas de la biotecnología en Colombia.* 1999. Oct, 21. Villavicencio, Meta.
- ⁷⁹ Howard CJ, Brownlie J, Clarke MC. Comparison by the neutralization assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet Microbiol* 1987; 13: 361-369. Shimizu M, Satou K, Nishioka N, Yoshino T, Momotani E, Ishikawa Y. Serological characterization of viruses isolated from experimental mucosal disease. *Vet Microbiol* 1989; 19: 13-21.
- ⁸⁰ Corapi WV, Donis RO, Dubovi EJ. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections. *J Virol* 1988; 62: 2823-2827.
- ⁸¹ Moennig V, Liess B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1995;11:477–87.
- ⁸² EDQM, 2001. In: *Proceedings of a Workshop on Pestivirus Contamination of Bovine Sera and Other Bovine Virus Contamination.* Paris, France, 29–30 March 2001.
- ⁸³ Paul-Pierre Pastoret. Human and animal vaccine contaminations. *Biologicals* 2010; 38: 332-334.
- ⁸⁴ Kozasa T, Aoki H, Nakajima N, Fukusho A, Ishimaru M, Nakamura S. Methods to select suitable fetal bovine serum for use in quality control assays for detection of adventitious viruses from biological products, *Biologicals* 2011; 1-7
- ⁸⁵ Harasawa R. and Tomiyama T. Evidence of pestivirus RNA in human vaccines. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(6): 1604–1605.
- ⁸⁶ Bolin S. R., Ridpath J. F., Black J., Macy M. and Roblin R. . Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods.* 1994; 48: 211.
- ⁸⁷ Barkema HW, Bartels CJ, van Wuijckhuise L, Hesselink JW, Holzhauser M, Weber MF et al. Outbreak of bovine virus diarrhea on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhea virus type 2. *Tijdschr Diergeneeskd* 2001; 126:158–65.
- ⁸⁸ Falcone E., Cordioli P., Tarantino M., Muscillo M., Sala G., La Rosa G., Archetti I.L., Marianelli C., Lombardi G. and Tollis M. Experimental infection of calves with Bovine viral diarrhoea virus type-2

(BVDV2) isolated from a contaminated vaccine. *Veterinary Research Communications*, 2003; 27: 577-589.

⁸⁹ Pastoret P-P, Blancou J, Vannier P, Verschueren C, editors. *Veterinary vaccinology*. Elsevier; 1997.

⁹⁰ Falcone E, Tollis M, Conti G. Bovine viral diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine*. 1999;14:18 (5-6):387-8.

⁹¹ Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th edition, 2008. Disponible en: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08_BVD.pdf

⁹² Thompson J. D., Higgins D.G., Gibson T.J., (1994) Clustal W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.

⁹³ Hall T.A. (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

⁹⁴ Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

⁹⁵ Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

⁹⁶ Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

⁹⁷ Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

⁹⁸ Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

⁹⁹ Córdova-Izquierdo, A.; Córdova-Jiménez, C.A.; Córdova-Jiménez, M.S.; Saltijeral- Oaxaca, J.A.; Ruiz-Lang, C.G.; Xolalpa-Campos, V.M.; Cortés-Suárez, S.; Guerra- Liera, J.E.: Seroprevalence of cattle abortive diseases from Mexican humid tropic. *Rev. vet.* 18: 2, 139–142, 2007

¹⁰⁰ Saldivar PVM, Posadas ME, Hernández-Ignacio J. Monitoreo serológico de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y diarrea viral bovina (DVB) en ganado de doble propósito en el municipio de Miacatlan Estado de Morelos. XXXIII Congreso Nacional de Buiatría 2009.

¹⁰¹ Solís-Calderón J.J., Segura-Correa V.M., Segura-Correa J.C. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine* 72 (2005) 253–262.

¹⁰² Cano CP, Lastra EM, García DG, Ramírez LJ, Retana RA, Monroy LF. Diagnóstico seroepidemiológico de las principales enfermedades en los bovinos de la zona norte de Chiapas. XXXIII Congreso Nacional de Buiatría 2009.

¹⁰³ <http://www.desarrolloporcicola.com/Reportes.html>

-
- ¹⁰⁴ McInerney JP, Howe KS, Schepers JA. A framework for the economic analyses of disease in farm livestock. *Prev Vet Med* 1992;13:137–54
- ¹⁰⁵ Bennett RM, Christiansen K, Clifton-Hadley RS. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. *Journal of Dairy Research* 1999;66:455–9.
- ¹⁰⁶ Houe Hans. Economic impact BVDV infection en dairies. *Biologicals* 31 (2003) 137-143.
- ¹⁰⁷ Laureyns J., Ribbens S., de Kruif A. Control of bovine viral diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives on the detection of persistently infected cattle. *The Veterinary Journal* 184 (2010) 21-26
- ¹⁰⁸ Bovine viral diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. Falcone E, Tollis M, Conti G. *Vaccine*. 1999 Oct 14;18(5-6):387-8.
- ¹⁰⁹ Falcone E. and Tollis M., 2000. Letter to the editor: Bovine viral Diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine*, 18 : 387-388.
- ¹¹⁰ Pastoret P-P, Blancou J, Vannier P, Verschueren C, editors. *Veterinary vaccinology*. Elsevier; 1997.
- ¹¹¹ T. Loken, J. Krogsrud* and I. Bjerkgs. 1991. Outbreaks of Border Disease in Goats Induced by a Pestivirus-Contaminated Orf Vaccine, with Virus Transmission to Sheep and Cattle. *J. Comp. Path.* 1991 Vol. 104
- ¹¹² Falcone E., Cordioli P., Tarantino M., Muscillo M., Sala G., La Rosa G., Archetti IL., Marianelli C., Lomabardi G., Tollis M. 2003. Experimental infection of calves with Bovine Viral Diarrhoea Virus Type-2 (BVDV-2) isolated from a contaminated vaccine. *Veterinary Research Communications*. 27; 577-589.
- ¹¹³ Vilcek, S., D.J., Greiser-Wilke, I., Durkovic, B., Oritzhauser W., Deutz A., Köfer J. 2003. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria). *Veterinary Microbiology* 285-291.
- ¹¹⁴ Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., Greiser-Wilke, I., Paton, D., 2004. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet. Res.* 35, 609–615.
- ¹¹⁵ Arias, P., Orlich, M., Prieto, M., Cedillo Rosales, S., Thiel, H.J., Alvarez, M., Becher, P., 2003. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. *Vet. Microbiol.* 96, 327–336.
- ¹¹⁶ Nagai, M., Hayashi, M., Itou, M., Fukutomi, T., Akashi, H., Kida, H., Sakoda, Y., 2008. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes* 36 (1), 135–139.
- ¹¹⁷ Jackova, A., Novackova, M., Pelletier, C., Audeval, C., Gueneau, E., Haffar, A., Petit, E., Rehby, L., Vilcek, S., 2008. The extended genetic diversity of BVDV-1: typing of BVDV isolates from France. *Vet. Res. Commun.* 32 (1), 7–11.

-
- ¹¹⁸ Jones L R., Zandomeni R., Weber LE. Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from Argentina. *Veterinary Microbiology* 81 (2001) 367-375.
- ¹¹⁹ Lunardi M, Headley SA, Lisboa JAN, Amude AM, Alfieri AA. Outbreak of acute bovine viral diarrhea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type vDVB strain subtype 1b.
- ¹²⁰ Studer Edgar, Bertoni Giuseppe and Candrian Urs. **Detection and Characterization of Pestivirus Contaminations in Human Live Viral Vaccines.** *Biologicals* Volume 30, Issue 4, December 2002, Pages 289-296
- ¹²¹ Giangaspero M, Vacirca G, Harasawa R, Büttner M, Panuccio A, De Giuli Morghen C, Zanetti A, Belloli A, Verhulst A. Genotypes of Pestivirus RNA detected in live virus vaccines for human use. *J Vet Med Sci* 63 (7): 723-733, 2001.
- ¹²² Giangaspero M, Vacirca G, Harasawa R, Büttner M, Panuccio A, De Giuli Morghen C, Zanetti A, Belloli A, Verhulst A. Genotypes of Pestivirus RNA detected in live virus vaccines for human use. *J Vet Med Sci* 2001; 63 (7): 723-733.
- ¹²³ Wensvoort g., Terpstra C. Bovine viral diarrhea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Research in Veterinary Science* 1988; 45, 143-148.
- ¹²⁴ Lohr C., Evermann j., Ward A. Investigation of dams and their offspring inoculated with vaccine contaminated by bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Medicine/ Small animal clinician.* 1983; 78 (8).
- ¹²⁵ Levings R. L. and Wessman S. J. Bovine viral Diarrhoea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. *Develop. Biol. Standard.* 1991; 75 : 177-181.
- ¹²⁶ Bolin S. R., Matthews P. J. and Ridpath J. F., 1991. Methods for detection and frequency of contamination of foetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J.Vet. Diagn. Invest.* 1991; 3 : 199-203.
- ¹²⁷ Miroslaw P.P. Jerzy R., Zmündzinski J. Contamination of foetal bovine serum with bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Bull Vet Inst Pulawy* 2008; 52, 501-505.
- ¹²⁸ Hongyan Xia, Balaje Vijayaraghavan, Sándor Belák, Lihong Liu. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial Foetal Serum Batches. *Plos ONE* 2011; 6 (12): 1-3
- ¹²⁹ Bolin S. R. and Ridpath J. F. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in foetal bovine serum. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998; 10: 135-139.
- ¹³⁰ Zabal O, Kobrak AL, Lager IA, Schudel AA, Weber EL. [Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhea virus]. *Rev Argent Microbiol.* 2000 Jan-Mar;32(1):27-32.
- ¹³¹ King A. A. and Harkness J. W. Viral contamination of foetal bovine serum. *Vet. Rec.* 1975; 97, 16. Kniazeff A. J., Wopschall L. J., Hopps H. E. and Morris C. S. (1975). Detection of bovine viruses in foetal bovine serum used in cell culture. *In Vitro* 11, 400-3.

¹³² Bolin S. R., Ridpath J. F., Black J., Macy M. and Roblin R. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods* 1994; 48: 211. Citado en: EDQM, 2001.

¹³³ Masayuki Yanagi, Jens Bukh, Suzanne U. Emerson, and Robert H. Purcell. Contamination of Commercially Available Fetal Bovine Sera with Bovine Viral Diarrhea Virus Genomes: Implications for the Study of Hepatitis C Virus in Cell Cultures. *The Journal of Infectious Diseases* 1996; 174: 1324-7

¹³⁴ Fernando Cobo . Glyn N. Stacey . Charles Hunt . Carmen Cabrera . Ana Nieto . Rosa Montes . José Luis Cortés . Purificación Catalina . Angela Barnie . Ángel Concha Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardization. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005

¹³⁵ Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th edition, Chapter 1.1.9 (5) 2008. Disponible en: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08_BVD.pdf

¹³⁶ Code of Federal Regulations. 9 CFR Chapter 1, section 113.53 (1995)

¹³⁷ NORMA Oficial Mexicana NOM-063-ZOO-1999, Especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales domésticos.

¹³⁸ Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th edition, Chapter 2.4.8 (1.d) 2008. Disponible en: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08_BVD.pdf

¹³⁹ C: Sandvik T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prv Vet Med* 2005; 72:3-16. Citado en: . Hilbe M., Stalder h., Peterhans E., Haessig M., Nussbaumer M., Egli C., Schelp C., Zlinszky K., Ehrensperger F. Comparison of five diagnostics methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves *J Vet Diagn Invest* 2007; 19:28-34