



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE
LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

Microbiología e inmunología

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLAMIENTOS DE
DIARREA VIRAL BOVINA CIRCULANTES EN MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JUAN CARLOS MARTÍNEZ NERIA

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA, FMVZ

COMITÉ TUTOR: DR. ROGELIO ALONSO MORALES, FMVZ

DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA, FMVZ

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2015



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:

A mis padres que me enseñaron que siempre hay que ir por más y no importa cuántas veces caigas lo que importa es como te levantas.

A Carmen, el amor de mi vida, que me ha dado la mayor felicidad, que cada día me impulsa a dar un paso adelante y con sus palabras me reconforta después de una jornada difícil que está a mi lado para apoyarme en mis locuras o llamarme la atención cuando la riego.

A Leonardo esa personita que jamás pensé que sin conocerla ya la amaba y que creció junto con este trabajo y gracias a él obtuve la fuerza para poder terminarlo.

A mis hermanos que en los momentos difíciles de la vida me han apoyado en todos los sentidos.

A la Dra. Rosa Elena, quien sin conocerme me dio la oportunidad de ser su alumno, a quien me tuvo que jalar varias veces las orejas y que con el paso del tiempo se convirtió en una gran amiga, a quien acudí constantemente por un consejo para salir adelante, quien se convirtió en cómplice para realizar este trabajo y con quien pude platicar solo para estar tranquilo.

A la QBP Mireya Romero, por permitirme conocerla, por confiar en mí, por darme la oportunidad de hacer todo lo que hago, por defenderme, por ayudarme, por ubicarme, por aconsejarme, por escucharme, por todo, si hay alguien en la vida a la que le debo algo es a usted, pues usted me ha educado y me ha hecho crecer tanto profesionalmente como espiritualmente, simplemente gracias.

Al Dr. Gilberto, quien me ayudo a sacar adelante este trabajo y me enseñó a trabajar de una manera diferente.

A mis compañeros de laboratorio, que me brindaron su apoyo durante la realización de este trabajo (Tere, Mario, Susana y Naomi)

Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

A Laboratorios Tornel S. A. por el financiamiento de este proyecto mediante el fondo Proinova-CONACyT-Laboratorios Tornel, S. A para el proyecto: “DESARROLLO DE VACUNA AUTÓCTONA BOVIRAL 5”, con numero de contrato 197928.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de México (UNAM), por su aceptación en el programa de posgrado.

A mi comité tutorial: Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, quienes me guiaron en la realización de este trabajo.

A mi jurado Dr. Fernando Osnaya Gallardo, Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara, Dra Rocio Gabriela Tirado Mendoza, Dra Leonor Huerta Hernández, que contribuyeron con sus comentarios para mejorar mi trabajo.

Al Dr. Gilberto Vaughan Figueroa, por su ayuda para poder finalizar este trabajo, además de sus consejos.

A los Doctores. Ricardo Flores, Atalo Martínez por su ayuda en la colección de muestras.

CONTENIDO

1.	Resumen	1
2.	Abstract	2
3.	Glosario de abreviaturas	3
4.	Introducción	4
	4.1. Replicación viral	11
	4.2. Variabilidad genética	13
	4.3. Situación actual del virus	15
	4.4. Manifestaciones clínicas	16
5.	Justificación	18
6.	Hipótesis	20
7.	Objetivo general	20
8.	Objetivos particulares	20
9.	Material y métodos	21
	9.1. Muestras	21
	9.2. Separación de linfocitos	23
	9.3. Extracción de ARN por columnas	23
	9.4. PCR multiplex	23
	9.5. Controles para PCR	24
	9.6. Línea celular	24
	9.7. Aislamiento viral en co-cultivo	25
	9.8. Extracción de ARN con Trizol	26
	9.9. Genotipificación de los aislados del VDVB	26

9.9.1. Genotipificación por ensayo de discriminación alélica por PCR en tiempo real (qPCR).	26
9.9.2. Genotipificación por RT-PCR duplex en punto final de la región 5'NTR	26
9.10. Análisis de variación nucleotídica	27
9.11. Caracterización genética de aislamientos	27
9.11.1. Genotipificación por análisis de la secuencia de la región 5'NTR	27
9.11.2. Genotipificación por análisis de la secuencia del gen completo de la gE2	27
9.12. Análisis filogenético.	28
10. Resultados	30
10.1. Análisis de muestras	30
10.2. Aislamiento viral	32
10.3. Genotipificación por PCR	33
10.3.1. Genotipificación por qPCR (ensayo de discriminación alélica)	33
10.3.2. Genotipificación por RT-PCR duplex en punto final de la región 5'NTR	34
10.4. Análisis de variabilidad nucleotídica.	35
10.5. Caracterización genética de aislamientos	36
10.5.1. Genotipificación mediante la secuenciación de productos de 5' NTR de los virus aislados	36
10.5.2. Genotipificación por análisis de la secuencia del gen completo de la gE2	39

10.6. Análisis filogenético de la región del gen codificante para la proteína E2	41
11. Discusión	43
12. Conclusiones	52
13. Referencias	54
14. Índice de figuras	64
15. Índice de cuadros	65
16. Anexo 1 Materiales y Reactivos.	66

RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es el patógeno más importante que afecta al ganado bovino ocasionando problemas respiratorios, diarrea, y en algunos casos abortos y malformaciones. El virus que provoca la enfermedad de Diarrea Viral Bovina es de cadena simple de 12,300 pb de longitud de sentido positivo con un solo marco de lectura que codifica para una poliproteína de 4000 aminoácidos, la cual se procesa por proteasas celulares y virales dando lugar a 12 proteínas (estructurales y no estructurales). Con base en el daño generado en cultivos celulares *in vitro* se puede clasificar como citopático o no citopático, así mismo se clasifica en diversos genotipos y subgenotipos debido a la acumulación de cambios a nivel genético que pueden conferir identidad y capacidades antigénicas diferentes a cada cepa. La caracterización de las cepas del VDVB solo se puede lograr por métodos moleculares analizando diferentes regiones del genoma. Las regiones no traducibles se han utilizado para diferenciar a los genotipos 1 y 2 pero es una región que provee limitada información en cuanto a otras características del virus, como antigenicidad o subgenotipificación. En el presente estudio se analizaron muestras de bovino de diferentes regiones de la Republica Mexicana con signología respiratoria mediante RT PCR punto final de la región no traducible del extremo 5' (NTR 5') y a partir de las muestras positivas al VDVB se llevaron a cabo aislamientos virales. Se determinó el genotipo de los aislamientos por medio de la secuenciación de esta misma región (NTR 5'), así como la estandarización de una prueba de RT PCR para la genotipificación de cepas de forma directa. Posteriormente se secuenció el gen completo de la glicoproteína de envoltura (E2) para obtener la caracterización molecular de los aislados incluidos en este estudio determinando de esta manera el subgenotipo al que pertenecen. Los resultados mostraron que los genotipos 1 y 2 circulan ampliamente en el país, la caracterización molecular del gen codificante para la glicoproteína E2 reveló una alta complejidad genética de los aislados circulante en México. En conclusión más de un genotipo del VDVB se encuentra circulando en la actualidad en el país, la composición genética de los aislados es considerablemente diferente lo cual tienen importantes implicaciones en el desarrollo y aplicación de una vacuna exitosa, por lo que, es necesario tomar en cuenta la variabilidad genética de la población del VDVB circulante en el país para la manufactura de preparaciones comerciales con aplicaciones en formulaciones destinadas a vacunación, así como para el desarrollo de técnicas de diagnóstico.

Palabras clave: VDVB, NTR 5', glicoproteína subgenotipo y genotipo.

ABSTRACT

Bovine Viral Diarrhea virus (BVDV) is the most important pathogen that affects cattle producing respiratory problems, diarrhea, and in some cases abortions and malformations. The virus causing the disease is single stranded positive sense with a length of 12,300 bp in a single reading frame encoding a polyprotein of 4000 amino acids, which is processed by cellular and viral proteases leading to 12 proteins (structural and nonstructural). Based on the generated damage in cell cultures in vitro it can be classified as cytopathic or non-cytopathic, likewise it is classified into various genotypes and subgenotypes due to the accumulation of changes at the genetic level which may confer identity and different antigenic capacities to each strain. The characterization of BVDV strains can only be achieved by molecular methods analyzing different regions of the genome. The untranslatable regions have been used to differentiate genotypes 1 and 2 but is a region that provides limited information regarding other features of the virus, such as antigenicity or subgenotificación. In the present study samples of cattle from different regions of the Mexican Republic with respiratory signology were analyzed by an end point RT PCR of the 5' untranslated region (5' UTR) and from positive samples to BVDV viral isolates were carried out. The genotype of the isolates was determined by sequencing of the same region (5' NTR), and the standardization of test RT PCR for genotyping strains directly. Subsequently the complete gene of the envelope glycoprotein (E2) was sequenced to obtain the molecular characterization of the isolates included in this study thus determining the subgenotype they belong. The results showed that genotypes 1 and 2 circulate widely in the country, the molecular characterization of the gene coding for the E2 glycoprotein revealed a high genetic complexity of the current isolates in Mexico. In conclusion more than one genotype of BVDV is currently circulating in the country, the genetic composition of the isolates is significantly different which have important implications for the development and implementation of a successful vaccine, so it is necessary to take into account the genetic variability of the population of BVDV circulating in the country for manufacturing applications in commercial formulations for vaccination, as well as for the development of diagnostic techniques.

Word keys: BVDV, UTR 5', glycoprotein, subgenotype y genotype.

Glosario de Abreviaturas:

Ácido ribonucleico	ARN
<i>American Type Culture Collection</i>	ATCC
<i>Border Disease Virus</i>	BDV
Cápside	C
Citopático	CP
Complejo respiratorio bovino	CRB
Estructural	E
Genotipo 1	G1
Genotipo 2	G2
Genotipo 3	G3
Glicoproteína E2	gpE2
Grados centígrados	°C
Herpes virus Bovino tipo 1	HVB-1
Interferón tipo 1	INF 1
<i>National Center for Biotechnology Information</i>	NCBI
No citopático	NCP
No estructural	NS
Región No Traducible	NTR
Parainfluenza Bovina tipo 1	PI-3
Pares de bases	pb
Persistentemente infectado	PI
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	qPCR
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Revoluciones por minuto	rpm
Sitio de reconocimiento de entrada al ribosoma	IRES
Transcriptasa Reversa	RT
Virus de Diarrea Viral Bovina	VDVB
Virus de la Hepatitis C	VHC
Virus Respiratorio Sincitial Bovino	VRSB

INTRODUCCIÓN

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es clasificado dentro del género *Pestivirus* en la familia *Flaviviridae*, junto con los *Pestivirus* se clasifican los *Flavivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus*. La organización genética así como sus características estructurales permiten clasificar estos virus como una sola familia, comparten características como: Genoma compuesto por una sola cadena de ARN en sentido positivo no poliadenilado el cual cuenta con un solo marco abierto de lectura, flanqueado por dos regiones altamente conservadas no codificantes (5' y 3') (Xu et al., 1997) lo que significa que el genoma codifica para una sola poliproteína la cual es procesada co y postraduccionalmente por proteasas tanto del virus como de la célula hospedera. El VDVB es un virus envuelto, la envoltura contiene glicoproteínas, esta se deriva por gemación a través de las membranas celulares durante el ensamblaje y la maduración de la partícula viral. El género *Flavivirus* es el que cuenta con mayor número de especies virales como Fiebre amarilla, Dengue etc. *Pegivirus* que recientemente fue clasificado dentro de esta familia (Ridpath, 2010), junto con los *Hepacivirus*, cuentan con un sola especie viral, *Pegivirus* y Hepatitis C respectivamente. Por otro lado, el género *Pestivirus* cuenta con cuatro especies virales: Border disease (enfermedad de las fronteras) que afecta a ovinos, Fiebre porcina clásica que afecta porcinos, Diarrea viral bovina genotipo I y Diarrea viral bovina genotipo II, estos últimos aunque se comportan de manera similar y presentan los mismos cuadros clínicos y afectación a las mismas especies del orden Artiodactyla son virus genética y antigénicamente muy distintos (Vilcek et al., 2001), únicamente se pueden diferenciar el uno del otro mediante métodos moleculares y desde el punto de vista económico el VDVB es el principal patógeno de este género en bovinos (Brodersen, 2014).

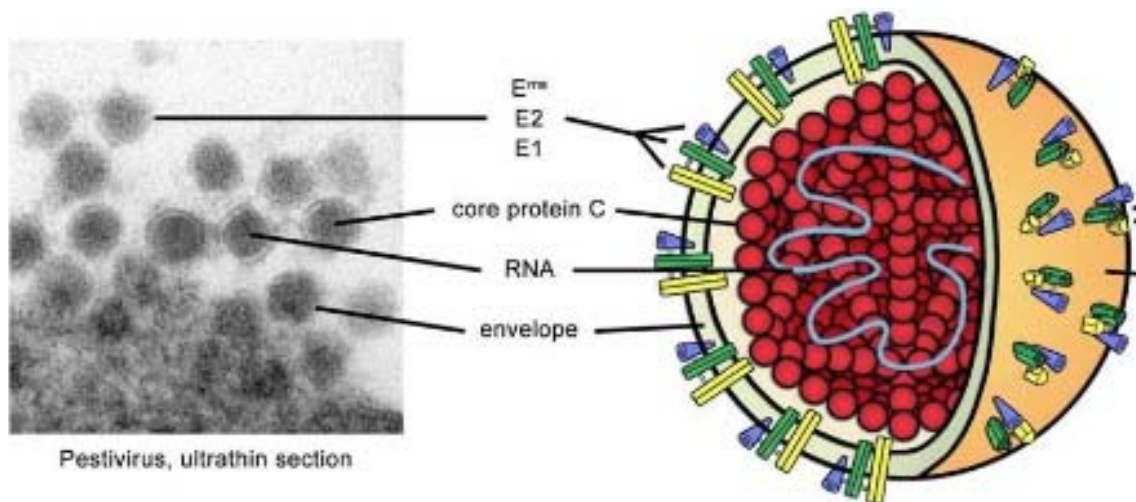


Figura 1. Representación esquemática del virus

El primer reporte que se conoce sobre el VDVB se realizó en 1946 como un virus que produce una enfermedad transmisible en ganado bovino en Nueva York, aunque se logró aislar por primera vez el agente causal hasta 1957 y fue nombrado VDVB. Posteriormente en Canadá apareció una enfermedad similar pero mucho más severa, la cual tenía baja prevalencia pero alta mortalidad. En Alemania y el Reino Unido se describieron enfermedades similares y fue cuando por medio de la prueba de seroneutralización se logró demostrar que las enfermedades reportadas tanto en Norte América como en Europa eran las mismas. Después de esto, también encontraron relaciones antigénicas con virus que afectaban a cerdos y a borregos (Fiebre porcina clásica y Enfermedad de la frontera respectivamente). En 1973, a este pequeño grupo de virus los clasificaron como género *Pestivirus* inicialmente ubicado dentro de la familia *Togaviridae*, esto al mismo tiempo en que el género *Flavivirus* fue incluido dentro de la misma familia que los *Pestivirus*. Con los avances en caracterización molecular de los virus se determinó que los *Flavivirus* tenían una estructura molecular, estrategias de replicación y organización genética diferente a varios virus de la familia *Togaviridae*; por lo que se reclasificaron como una nueva familia (*Flaviviridae*). Así mismo en 1991 al publicarse la secuencia completa de la cepa NADL del VDVB se determinó que los *Pestivirus* eran mucho más parecidos a la familia *Flaviviridae* que a la familia *Togaviridae* incluyéndose así al género *Pestivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. Años más tarde, a través de

análisis filogenéticos de aislamientos caracterizados como VDVB basados en cuadros clínicos presentados en los animales de origen de los aislamientos revelaron la existencia de dos grupos genéticos: VDVB 1 y VDVB 2, con esto el género *Pestivirus* creció a cuatro integrantes (Ridpath, 2010). En 2004, se llevó a cabo el aislamiento de un *Pestivirus* a partir de muestras de suero fetal bovino proveniente de Brasil, posteriormente se realizaron más aislamientos en Sudamérica y Asia los cuales fueron agrupados con estos mismos virus mediante análisis filogenético. Algunos aislamientos se realizaron de animales identificados como persistentemente infectados, otros más de suero fetal bovino y uno se realizó en un búfalo. Debido a la similitud con la infección y la capacidad de generar animales persistentemente infectados se ha sugerido por diferentes autores se agrupen como VDVB genotipo 3 (Ridpath, 2010).

El tamaño del genoma del VDVB es de aproximadamente 12,500 pb pero esto puede variar debido a que existen biotipos diferenciados. El biotipo citopático puede presentar inserciones a nivel de la proteína NS2/NS3 lo que favorece su procesamiento y expresión de forma independiente y por lo tanto se incrementa el tamaño del genoma y dando origen a 12 proteínas NH₂-Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (Vilcek et al., 2001, Neill, 2013). Mientras que en el biotipo no citopático la proteína NS2/NS3 permanece como una sola teniendo en este caso solo 11 proteínas (Vilcek et al., 2001, Neill, 2013).

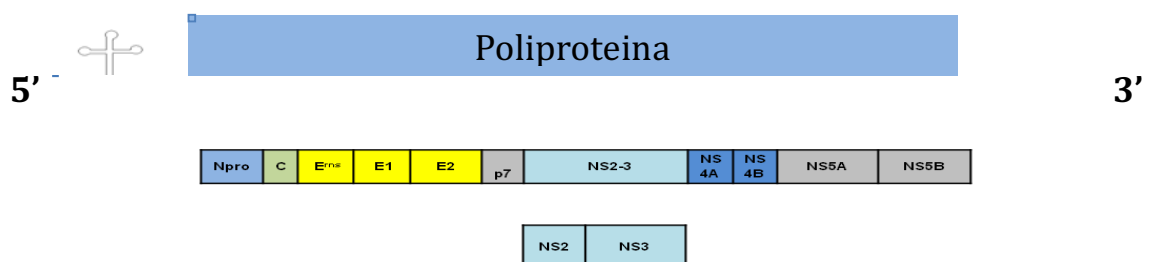


Figura 2: Organización del genoma del VDVB. NS2/NS3 en virus no citopáticos, NS2 y NS3 en virus citopáticos y en infecciones tempranas por virus no citopáticos.

Npro es una cistein-proteasa similar a la papaína, su actividad sobre la Proción N-terminal de la Poliproteína da como resultado una proteína de la nucleocápside madura, aunque esta es su principal actividad varios estudios han demostrado que Npro tiene actividad sobre el sistema inmune ya que funciona como antagonista del interferón (INF), mediante el bloqueo del factor regulador de interferón 3 (Peterhans et al., 2010), se piensa que esto puede estar relacionado con el establecimiento de la infección persistente y la tolerancia inmune en el ganado. Por otro lado se ha demostrado que esta proteína es poco antigénica por lo que ella sola no es capaz de despertar una respuesta inmune protectora (Mishra et al., 2010).

5' Región No Traducible (NTR) región situada en la posición amino terminal del genoma del virus de VDVB contiene una región promotora del inicio de la traducción de la poliproteína viral (IRES), esta región del genoma contiene dominios estructurales I, II, III y un gen pseudo nudo en la región carboxilo terminal del codón de inicio que es esencial para la actividad del IRES (Poole et al., 1995).

La proteína C o proteína de cápside, como su nombre lo dice conforma la nucleocápside del virus, es la primer proteína estructural que se puede encontrar en la poliproteína en el extremo amino y es altamente conservada (Neill, 2013).

E^{RNS} es una glicoproteína estructural que forma homodímeros y se encuentra en la envoltura viral, tiene actividad de RNasa a diferencia de las proteínas estructurales E1 y E2 esta glicoproteína no permanece anclada a la membrana; si no que puede desvincularse fácilmente de esta, por otro lado esta proteína también puede ser secretada por las células infectadas (Lazar et al., 2003), no participa en la entrada del virus a la célula (El Omari et al., 2013). Diversos estudios sugieren que participa en la evasión de la respuesta inmune llevando a cabo la degradación de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple y de doble cadena, que son características durante la presencia de infecciones virales, impidiendo la producción de INF I en la célula. (Bruschke et al., 1997, Neill, 2013, Peterhans et al., 2010).

E1 es una de las glicoproteínas estructurales que conforman la envoltura del virus y forma homodímeros y heterodímeros junto con la glicoproteína E2, lo que es esencial para la entrada del virus a la célula (Neill, 2013, Ridpath, 2010). En el virus Hepatitis C (VHC) se ha demostrado que esta proteína cuenta con dominios trans-membranales que poseen una secuencia señal en la porción carboxilo terminal que juega un papel importante en la localización de esta proteína en el retículo endoplásmico (Ronecker et al., 2008).

E2 es la glicoproteína estructural de mayor importancia antigénica del virus, la cual es esencial para la entrada del virus a la célula debido a que es la proteína de unión al receptor de esta (Tscherne et al., 2008), esta proteína forma heterodímeros con E1, este complejo permite la fusión con la membrana del hospedero favorecido por la disminución del pH dentro del endosoma (El Omari et al., 2013). Es una proteína sometida constantemente a presión de selección por lo cual es una proteína altamente variable entre cepa y cepa, esto debido a que esta proteína es el blanco de la mayor parte de los anticuerpos neutralizantes del virus.

La glicoproteína E2 (53 kDa) se encuentra en la envoltura del virión, es una proteína transmembranal tipo I con una región N-terminal y una α -hélice en el carboxilo terminal anclada a la membrana, E2 es una molécula dimérica que contiene cuatro dominios DA, DB, DC y DD, dispuestos linealmente del extremo N- al C- terminal. Los dominios DA y DB (residuos 4-87 y 88-164) son los más distales de la envoltura viral y es probable que sean los más expuestos en la superficie del virus, el dominio DD es el más conservado entre los pestivirus, los dímeros están covalentemente estabilizados por un puente disulfuro, compuesto por un bucle extendido que une al dominio DC a la horquilla de la lámina β (Figura 3) (El Omari et al., 2013).

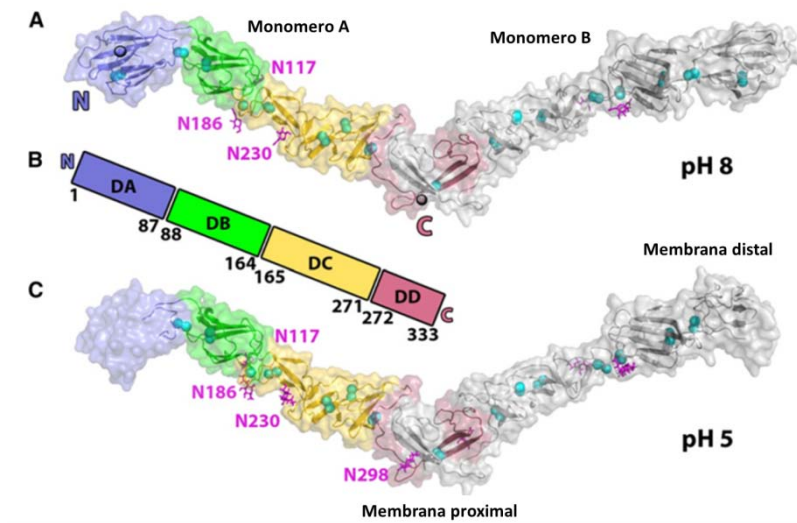


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del cristal de gpE2, mostrando los cuatro dominios DA, DB, DC y DD. A) Representación de la estructura del cristal a pH=8. B) estructura lineal de la E2 del VDVB. Modificado de (El Omari et al., 2013).

P7 es esencial en la formación del virión, aunque su función no es muy clara (Neill, 2013), en el virus de hepatitis C esta proteína cumple con la actividad de canal de protones impidiendo la acidificación mientras transitan por compartimentos intracelulares, protegiendo de esta manera partículas sensibles al pH ácido (Boson et al., 2011).

NS2/3 es una proteína altamente conservada; por lo que es muy utilizada para diagnóstico, esto basado en la detección de antígenos no estructurales generados post-infección (Ridpath, 2010). Se ha demostrado que esta proteína juega un papel muy importante en la producción de viriones infecciosos debido a que puede actuar como un andamio para reclutar los componentes del virión al sitio de ensamblaje de la nucleocápside, por lo que es indispensable para el montaje o la salida de partículas de VDVB. Esta proteína se mantiene en esta forma debido a un procesamiento incompleto de la misma o por la duplicación de esta proteína en otra parte del genoma (Agapov et al., 2004).

NS3 esta proteína no estructural desempeña diversas funciones durante la replicación del virus; es una helicasa, proteasa y ATP asa (Agapov et al., 2004, Choi et al., 2004), además es responsable junto con la proteína NS4 de la escisión de las proteínas contiguas al extremo carboxilo de esta, por otro lado regula la expresión de interferón β desencadenando la apoptosis por la vía intrínseca favorecida por el aumento de actividad de la caspasa 9 y la caspasa 3 (Gamlen et al., 2010).

NS4A proteína no estructural, durante la replicación funciona como cofactor de la proteína NS3 cuando esta actúa como proteasa (Agapov et al., 2004), también se ha descrito su participación en la evasión de la respuesta inmune innata bloqueando la eliminación de ARN de doble cadena, favoreciendo de esta forma la replicación viral (Mohamed et al., 2014).

NS4B no se conoce con exactitud la importancia de esta proteína durante la replicación viral pero se ha demostrado que es una proteína estructural de membrana, se asocia al aparato de Golgi, así como a mitocondrias y membranas inducidas por el virus debido a que tiene cuatro dominios transmembranales, es un componente integral del complejo de replicación. Por otro lado se piensa que es una proteína implicada en el mecanismo de citopatogenicidad a través de la vía intrínseca de la apoptosis por la activación de caspasa 9 (Weiskircher et al., 2009, Gamlen et al., 2010).

NS5A las funciones de esta proteína, se han descrito para el virus de la Hepatitis C, en el cual promueve la progresión a la enfermedad llevando a daño hepático debido a que inhibe la actividad de la proteína quinasa (PKR), un mediador importante de la respuesta anti-viral (INF), la apoptosis y la proliferación celular, además de promover la activación transcripcional lo que afecta la señalización celular (Preciado et al., 2014). En el VDVB su función no se ha descrito de forma clara solo se ha determinado que participa durante el proceso de replicación (Neill, 2013, Ridpath, 2010). Por otro lado se ha reportado que tiene cierta actividad de inhibición del factor de necrosis tumoral alfa mediado por la activación del factor nuclear κB (NF κB).

NS5B es una proteína no estructural que cumple con la función de ARN polimerasa dependiente de ARN, esta proteína está estrechamente relacionada con el control del balance entre la acumulación de genoma en sentido positivo sobre el genoma en sentido negativo (Agapov et al., 2004).

Replicación viral.

La entrada del VDVB a la célula es un proceso de varios pasos: unión del virión con el receptor celular, internalización y la fusión de membrana. CD46 ha sido reconocido como el receptor celular en bovinos para la entrada del VDVB, así mismo se ha demostrado que el virus es internalizado mediante la vía de endocitosis dependiente de clatrina (Mathapati et al., 2010, Grummer et al., 2004) una vez que el virus ha sido internalizado a la célula es necesario que se lleve a cabo una fusión con el endosoma temprano, esta fusión es dependiente de pH (acidificación) donde se ha demostrado que la proteína mas importante en este proceso es la Glicoproteína E2 (gp E2) (Gamlen et al., 2010)., este mecanismo también se ha reportado en otros miembros de la familia *Flaviviridae*, tales como en HVC y algunos otros virus del genero *Flavivirus* (Krey et al., 2005, Meertens et al., 2006). El resultado de la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma permite la liberación de la nucleocápside en el citoplasma celular, seguido por el desnudamiento del ARN genómico de sentido positivo, lo cual permite que este sea traducido en una poliproteína la cual es procesada de manera co y pos traduccionalmente (Buckwold et al., 2003).

La primera proteína expresada por la poliproteína es la auto-proteasa Npro, la cual rompe su enlace en su extremo carboxilo, con la proteína C, posteriormente las proteínas estructurales son procesadas por medio de señales en donde actuaran proteasas celulares. Las proteínas estructurales son procesadas por la proteasa viral NS3 (Neill, 2013).

Complejos de replicación asociados a membrana, contienen la ARN polimerasa viral dependiente de ARN la cual copia el ARN genómico de sentido positivo en ARN en sentido negativo, el cual servirá como templado para dar origen a moléculas de ARN en sentido positivo los cuales se incluirán dentro de los viriones (Buckwold et al., 2003).

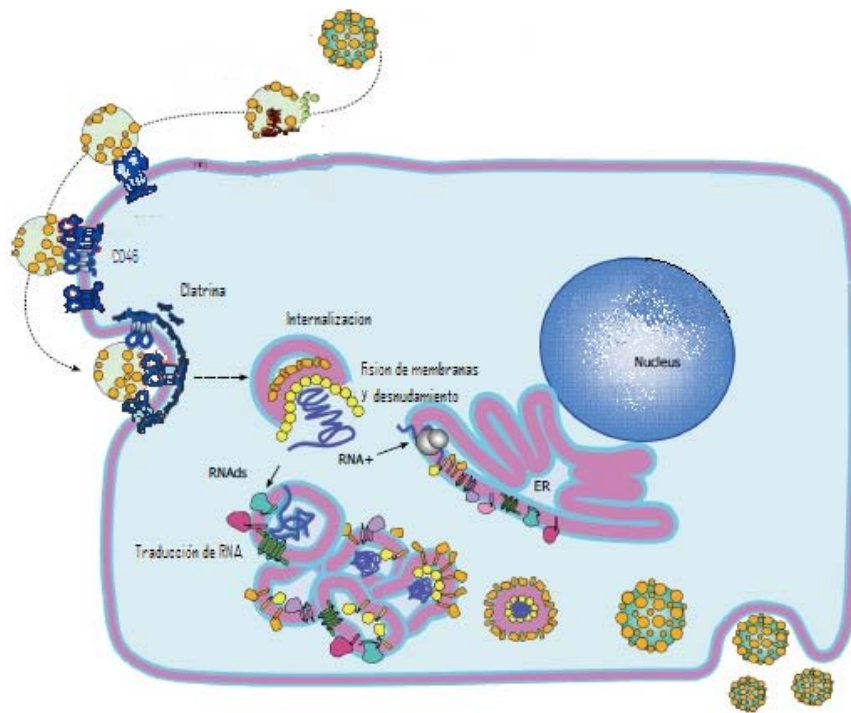


Figura 4 Replicación del VDVB. La proteína E2 del VDVB es reconocida por el receptor celular (CD46), el virus es internalizado por endocitosis mediada clatrina. Se lleva a cabo el desnudamiento de la nucleocápside por fusión de membranas así como el desnudamiento del genoma, traducción del genoma y procesamiento de la poliproteína. El ensamblaje se lleva a cabo en el retículo endoplásmico.

El proceso de maduración de las glicoproteínas así como el ensamblaje de los viriones ocurre en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi así como en compartimentos intermedios. Por último los viriones son secretados de las células por medio de la vía secretora de la membrana plasmática (Buckwold et al., 2003, Grummer et al., 2004).

Variabilidad Genética.

El VDVB se puede clasificar en biotipos, genotipos y subgenotipos. Los biotipos se basan en la presencia o ausencia de efecto citopático visible en cultivos de células infectadas, citopáticos (CP) o no citopático (NCP), esto está directamente relacionado con la presencia de cambios genómicos, mutaciones puntuales o recombinaciones no homólogas de ARN que conducen a la inserción de secuencias virales o celulares por actividad proteolítica derivada de la célula hospedera que interfieren y procesan a la proteína NS2/3, en NS2 y NS3 (Neill, 2013, Peterhans et al., 2010). El genotipo se ha clasificado basado en la divergencia entre las secuencias del genoma viral reveladas por el análisis filogenético en el que se usan diferentes regiones como 5' NTR que es la región más conservada entre los pestivirus pero que a su vez posee zonas hipervariables, se ha obtenido que la similitud entre 5' NTR de diferentes genotipos es del 76.6 al 92.6% y entre genotipos es de 85.2 al 100%. Así mismo, la región que codifica para la proteína Npro es utilizada para este análisis, de donde la similitud obtenida entre subgenotipos va del 80.0 al 100 % y del 71.9 al 88.1 entre subgenotipos (Vilcek et al., 2001). Una región continuamente estudiada debido a su gran variabilidad, es la que codifica para la glicoproteína E2 en donde se puede obtener un porcentaje de divergencia entre genotipos que va desde 41.4 al 67.8, entre subgenotipos el porcentaje de divergencia va de 17.4 al 48.0 así mismo se ha analizado la divergencia que existe dentro de un mismo subgenotipo la cual se estima en 18.8 % (Becher et al., 1999). Hasta hace algunos años se habían descrito dos genotipos (VDVB G1 y VDVB G2) actualmente se menciona y describe un tercero, que es VDVB G3 (Choi et al., 2004, Ridpath, 2010). VDVB G1, G2 y G3 se clasifican adicionalmente en subgenotipos, utilizando como estrategia la comparación de secuencias de regiones más variables del genoma viral en las que se ha logrado establecer para el G1 17 subgenotipos, mientras que para el G2 sólo VDVB 2a, VDVB 2b y VDVB 2c, así mismo se describen tres subgenotipos para el G3 (Fulton et al., 2005, Minami et al., 2011, Peterhans et al., 2010, Vilcek et al., 2001, Giammarioli et al., 2015).

Variabilidad antigenica

Con respecto a las diferencias antigénicas se ha demostrado que se pueden detectar a través de pruebas serológicas a base de anticuerpos monoclonales y pruebas de seroneutralización cruzadas, estas pueden ser tan marcadas que se puede permitir la diferenciación entre cepas, lo que puede representar un problema muy fuerte para el diagnóstico y en las estrategias de vacunación (Botton et al., 1998). Se ha descrito que la variabilidad de las cepas esta mayormente relacionada con la ubicación geográfica ya que las cepas que se han encontrado en un mismo lugar al hacer el análisis a través del tiempo en rebaños afectados con el VDVB tuvieron menor porcentaje de variación entre sí que contra las mismas cepas encontradas en diferentes regiones geográficas. Por otro lado y debido a que las cepas de una misma zona conservan características genéticas similares es posible, rastrear el origen de las cepas mediante su caracterización genética, determinando así en qué momento sucedió alguna introducción en un hato (Vilcek et al., 2003).

Siguiendo el contexto de la variabilidad antigénica se ha considerado como candidato para la vacunación el gen E2 del VDVB que codifica para una glicoproteína estructural de 53 kDa que contiene un epítipo neutralizante que varía entre las cepas (Botton et al., 1998). La glicoproteína E2 ha sido descrita como el principal objetivo de la respuesta inmune mediada por anticuerpos neutralizantes del hospedero, esta proteína inmunodominante es la menos conservada y se ha especulado que el anticuerpo neutralizante contribuye a la fijación de sustituciones de aminoácidos en el genoma viral como resultado de la supervivencia exclusiva de mutantes de E2 que escapan a la neutralización, este es un aspecto muy importante de esta glicoproteína aunque el proceso no está muy claro en la generación de variantes virales, otras investigaciones también lo atribuyen a la baja capacidad de la polimerasa viral para reparar errores durante la transcripción también colabora en este fenómeno (Loy et al., 2013, Collins et al., 1999) en estudios realizados por Kalaycioglu et al., (2012) se destaca la importancia de la variabilidad en la porción aminoterminal del gen de la proteína E2 en donde un cambio en una aminoácido evita el reconocimiento

de esta por un anticuerpo monoclonal específico (Kalaycioglu et al., 2012). La diversidad del gen E2 también puede indicar la prevalencia de los genotipos del VDVB en el campo y ser útil para la estimación de la patogenicidad (Tajima, 2004).

Situación actual del virus

Esta enfermedad esta propagada por todo el mundo, es una de las enfermedades con mayor impacto en las producciones bovinas que resulta en grandes pérdidas económicas. Se estima en Estados Unidos que las pérdidas pueden llegar a ser de 10 – 40 millones de dólares por millón de partos (Fulton et al., 2005). Por otra parte se menciona que a mayor parte de las pérdidas ocasionadas por este virus a los ganaderos, están principalmente relacionadas con los gastos en la prevención de la enfermedad así como en el tratamiento de animales enfermos.

El G1 del VDVB presenta una mayor distribución en el mundo siendo en el continente europeo donde se han reportado la mayor cantidad de subgenotipos (1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h 1j, 1k y 1l), siendo Italia uno de los países con el mayor numero de cepas presentes. Mientras que en Asia se han reportado los genotipos 1a, 1b, 1c, en Oceanía 1a y 1c, en el continente africano específicamente en Sudáfrica se ha reportado la presencia del VDVB G1 aunque no se ha reportado subgenotipo. Por último en América se ha descrito la presencia de VDVB 1a y 1b (Vilcek et al., 2003).

El G2 al igual que el G1 se encuentra distribuido en los cinco continentes pero la mayor prevalencia esta reportada principalmente en América donde se ha reportado la presencia de los genotipos 2a, 2b y 2c principalmente en Estados Unidos y Sud América.

El G3 se ha reportado principalmente en suero fetal bovino proveniente de Sud América, México, Estados Unidos, Canadá y Australia. Pero las infecciones naturales en bovinos se han reportado principalmente en Sudamérica, en el Sureste de Asia y en Italia, donde se realizó el primer hallazgo en Europa (Luzzago et al., 2014).

Actualmente en México existen muy pocos datos sobre la situación de la enfermedad pero en estudios realizados en diferentes zonas del país (Solis-Calderon et al., 2005) demuestran mediante estudios serológicos seroprevalencias de cerca del 15% en ganado bovino de Yucatán, en 2008 Cantú y colaboradores de hasta un 55% de seroprevalencia en animales en vida silvestre (Cantu et al., 2008, Segura-Correa et al., 2010), en 2009 Segura-Correa *et al* reportó la incidencia acumulada global estimada durante los 12 meses de estudio del 16,6% en Michoacán. Meléndez *et al* en 2010 reportó una seropositividad de hasta 92 % en un estudio realizado en Aguascalientes entre las especies domésticas que afecta se encuentran suinos, ovinos y caprinos, y de las especies reportadas en vida silvestre principalmente venado cola blanca.

Manifestaciones clínicas

Una vez que el virus entra en contacto con las membranas del epitelio respiratorio inicia la replicación. El virus presenta tropismo por células mitóticamente activas (Linfocitos, fagocitos, monocitos, epitelio, etc).

Existe evidencia de protección inmunológica cruzada entre subgenotipos y genotipos, pero se ha demostrado en diferentes estudios que la inmunidad proporcionada por un genotipo contra uno diferente es incompleta aunque entre subgenotipos no se conoce exactamente cuál es la situación.

Aunque se ha reportado que el genotipo 1 es menos virulento que el genotipo 2 existen estudios donde reportan las manifestaciones clínicas no son específicas de un genotipo o biotipo del virus y además la virulencia puede estar asociada a factores diferentes del biotipo o genotipo (Ridpath and Bolin, 1991, Brodersen, 2014). VDVB es responsable de inducir una amplia gama de enfermedades clínicas en el ganado, incluyendo enfermedades respiratorias, problemas reproductivos y trastornos clínico-patológicos constantemente asociados con la enfermedad entérica aguda, la cual se conoce como DVB transitoria, esta se presenta principalmente debido al establecimiento de una infección en animales jóvenes o adultos, tanto por cepas citopáticas o no citopáticas, esta enfermedad normalmente es controlada por el sistema inmune de los animales. (Lanyon et al., 2014). La patogenicidad de la infección por el

VDVB no se conoce completamente, sin embargo se ha descrito que el resultado de una enfermedad fetal es determinado por la edad del feto y el tipo de cepa asociada a la infección, teniendo así que el feto es particularmente vulnerable durante los primeros 6 meses de gestación, el virus puede ocasionar fallas en la implantación, muerte y reabsorción embrionaria, momificación, aborto, enfermedades congénitas debido a la presencia de infección por cepas CP y NCP. El biotipo no citopático puede producir durante la gestación temprana (entre el día 40 y 120) una inmunotolerancia en el feto que puede resultar como consecuencia en el nacimiento de un becerro persistentemente infectado (PI) (Fulton et al., 2005, Lanyon et al., 2014), este animal PI puede diseminar el virus durante toda la vida a animales susceptibles, este mismo animal PI después de varios meses o años de infección por una cepa NCP la cual al coexistir con una cepa CP (superinfección) puede desarrollar un cuadro agudo de la enfermedad comúnmente denominado enfermedad de las mucosas que en el mayor número de caso provocara la muerte del animal, cabe mencionar que este proceso se puede llevar a cabo de dos formas, la primera se presenta cuando un animal PI es infectado de manera natural por una cepa CP. La segunda vía por la cual se puede llegar a presentar la enfermedad de las mucosas es cuando una cepa NCP que existe en un animal PI a través del tiempo llega a sufrir una mutación específicamente a nivel de la región del genoma que codifica para la proteína NS2/3, favoreciendo la síntesis de la proteína NS3 de manera constante cambiando el biotipo del virus mutante cepa CP. La antigenicidad y patogenicidad tienen una estrecha relación con el desarrollo de manifestaciones clínicas en bovinos persistentemente infectados con VDVB (Peterhans et al., 2010).

Las estrategias actuales para reducir las pérdidas causadas por el VDVB en hatos infectados incluyen la vacunación con virus activo modificado o vacunas inactivadas y la eliminación de los animales infectados persistentemente. Actualmente se encuentran en desarrollo diversas vacunas recombinantes o vectorizadas; sin embargo aún no están disponibles comercialmente.

JUSTIFICACIÓN

Las diferentes cepas del virus de diarrea viral bovina contienen dentro de su genoma regiones altamente conservadas entre estas y que pueden ser fácilmente reconocidas mediante diferentes métodos de diagnóstico y tipificación, pero dentro del mismo genoma se han diferenciado secuencias que codifican para proteínas que intervienen directamente en el proceso de infección de un virus a una célula, estas proteínas son de alto valor antigénico, ya que por un lado son los sitios que están totalmente expuestos y que pueden ser reconocidos por anticuerpos y por otro lado son las proteínas que se unirán al receptor de las células para dar inicio a la infección viral, por tal motivo estas proteínas están constantemente sometidas a una fuerte presión de selección, esto influye para que constantemente estas regiones sufran cambios en el genoma que le permitan evadir las barreras inmunológicas propias del organismo hospedero y conservar sus características infectivas que le permitan perpetuar su ciclo de replicación (Loy et al., 2013).

Esta característica que tiene el virus de poseer sitios hipervariables es la que representa un gran reto tanto en el diagnóstico como en la prevención de la enfermedad, estos sitios son representados de manera principal por la glicoproteína E2.

Diversos estudios han demostrado mediante pruebas de seroneutralización que las cepas de campo circulantes difieren antigénicamente de las cepas de referencia utilizadas en pruebas de diagnóstico y vacunas. Por otro lado, se ha comprobado que al enfrentar las cepas de campo contra anticuerpos monoclonales específicos para diferentes regiones antigénicas de una cepa de referencia existe un reconocimiento casi total en el caso de las regiones antigénicas de sitios conservados del virus, pero en el caso específico de la región hipervariable se ha observado poco o casi nulo reconocimiento de este por parte de los anticuerpos monoclonales (Minami et al., 2011, Botton et al., 1998).

La gran mayoría de las pruebas de diagnóstico comerciales utilizadas en el mundo son fabricadas con antígenos de referencia o aislamientos virales de

regiones diferentes o alejadas de las zonas donde se aplicará la prueba, lo que puede producir una gran cantidad de falsos negativos. De esta misma forma las vacunas pueden fallar en la inmunización contra cepas circulantes en el país donde se aplican (Ridpath, 2010, Fulton et al., 2005). Además del gasto en vacunación y diagnóstico, el VDVB puede producir baja en la productividad, inmunosupresión, disminución de la fertilidad, abortos, malformaciones, muertes y animales PI que diseminaran constantemente el virus representando una mayor pérdida económica para el ganadero.

En México se desconocen las cepas del VDVB que circulan, a pesar de esto se vacuna y se diagnostica sin determinar el éxito de ambos procedimientos. Tomando en cuenta los datos antes mencionados cobra mayor relevancia la caracterización genética de cepas de campo y determinar qué tan parecidas son a las cepas de referencia y entre sí para determinar si realmente son representativas, esto será de gran importancia para el establecimiento de nuevas pruebas de diagnóstico y vacunas, ambas fabricadas con antígenos obtenidos de aislamientos nacionales.

HIPÓTESIS

Los virus de Diarrea Viral Bovina G1 y G2 están presentes en muestras clínicas obtenidas de animales que al momento de ser muestreados presentaron signos clínicos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar a los virus de complejo respiratorio bovino (CRB) en muestras clínicas y caracterizar genéticamente, mediante el uso de pruebas moleculares al virus de Diarrea Viral Bovina aislado de las muestras antes mencionadas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar muestras positivas a los virus del CRB a partir de muestras clínicas de animales con signología respiratoria mediante RT-PCR multiplex
- Realizar el aislamiento viral a partir de las muestras positivas al VDVB.
- Realizar análisis de variabilidad nucleotídica
- Realizar genotipificación y subgenotipificación de cepas de VDVB aisladas mediante el análisis de:
 - La región 5' NTR (Secuencia)
 - La región que codifica para la proteína E2 (Secuencia)
- Estandarizar la reacción de RT-PCR para genotipificación del VDVB
- Analizar la relación filogenética de los aislados mexicanos de VDVB
- Establecer como está compuesta de la población viral circulante en diferentes regiones de México

MATERIAL Y MÉTODOS.

Muestras

Las muestras utilizadas en el presente trabajo se obtuvieron de ganado bovino de 8 estados de la República Mexicana: Estado de Chiapas, Distrito Federal, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Oaxaca y Tabasco debido a que en estos estados se concentra gran parte del ganado en México, por otro lado son regiones que por sus condiciones climáticas favorecen la presencia del CRB así como los sistemas de explotación, el tipo de ganado fue indiferente ya que se obtuvieron tanto de ganado cárnico como lechero y de doble propósito aunque el que se muestreo en mayor proporción fue ganado de doble propósito, por otra parte es importante que aunque se muestrearon animales de diferentes edades, la mayor parte de estos fueron animales jóvenes menores de 12 meses (Cuadro 1). Los ranchos de donde se obtuvieron las muestras tienen como particularidad que no se vacuna contra el CRB. Los animales seleccionados para la obtención de muestras presentaron al momento de realizar el muestreo, signos clínicos sugerente de un cuadro por CRB, los cuales fueron problemas respiratorios, fiebre, neumonías entre otros, por lo que fue muy importante la época en la que se realizó el muestreo este se realizó entre los meses de septiembre de 2013 a febrero del 2014 que corresponden, inicialmente a temporada de lluvias y al final, temporada de frío.

Estados	Animales muestreados	Sangre	Biopsia	Municipios	Ranchos	Edad en meses	Vacunación vs CRB
Chiapas	162	162	162	10	16	135<12; 27<24	No vacuna
Distrito Federal	80	80	80	1	1	Sin dato	Sin dato
Guerrero	17	17	0	1	2	Sin dato	Sin dato
Hidalgo	8	8	0	1	2	Sin dato	Sin dato
Jalisco	41	23	41	1	6	Sin dato	Sin dato
México	43	43	43	4	9	4≤12; 14≤24, 6>24	No vacuna
Oaxaca	33	33	33	6	8	23<12; 3<24	Sin dato
Tabasco	149	149	149	10	17	92<12; 30<24 7>24	31
Total	533	515	508	34	61	N/A	N/A

Cuadro 1. Distribución del muestreo realizado en los estados analizados.

En el muestreo no se tomó en cuenta la edad de los animales. Las muestras que se obtuvieron, fueron muestras de sangre completa con heparina (515) las cuales se obtuvieron por punción en vena coccígea con agujas Precision Glide NeedleS 16 G x 1 1/2 in (BD360212 Becton Dickinson) y tubos Vacutainer™ con heparina (367884 Becton Dickinson) y biopsia de oreja obtenida mediante muesqueo (508) (Muesqueador de orejas Vetpro®) (Cuadro 1). Las muestras de sangre con heparina se transportaron en refrigeración (5 ± 3 °C) desde el punto de muestreo hasta el laboratorio donde se procesaron para su análisis, las muestras de biopsia de oreja y suero se transportaron en nitrógeno líquido desde el punto de muestra hasta el laboratorio donde se conservaron a -80 °C, hasta su procesamiento. Todas las muestras se registraron junto con una breve historia clínica.

Separación de linfocitos de sangre total.

La sangre colectada se procesó para su análisis mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa PCR, se realizaron tres lavados, con los que se eliminó casi en su totalidad los eritrocitos, esto se logró por medio de choque osmótico con agua destilada, y adición de solución amortiguadora de fosfatos a una concentración 2X y centrifugación para separar leucocitos de los detritos celulares. Los leucocitos recuperados después de este proceso, se conservaron en congelación a -80 °C hasta su uso, se realizaron alícuotas las cuales se utilizaron para la extracción de ARN.

Extracción de ARN por columnas.

Los Leucocitos obtenidos de las muestras de sangre completa, se utilizaron para la extracción de ARN total por columnas con el kit RNeasy Mini Kit (74106 Qiagen), esto se realizó siguiendo la técnica del fabricante. Se utilizaron 140 µl de la suspensión de leucocitos los cuales se colocaron en viales estériles de 1.5 ml (MCT-150-C Axygen), en donde se lisaron con 540 µl de buffer de lisis con acarreador, posteriormente la muestra, se hizo pasar a través de las columnas por centrifugación (Centrifuga refrigerada para microtubos (TermoFisher) Cat: Legend RT II), donde por medio de cargas se retiene el ARN, así mismo se realizaron los lavados con los buffers incluidos en el mismo. Al final se realiza la elución del material genético, utilizando buffer AVE, en un tubo nuevo identificado previamente, el cual se conservó en congelación a -80° C hasta su uso en la prueba de RT PCR.

PCR Multiplex

Para la prueba de PCR se utilizó un protocolo el cual es un ensayo múltiple, en este se determina la presencia de los virus del CRB de manera simultánea en una sola reacción. Los iniciadores utilizados en este ensayo se encuentran bajo la patente MX/E/2012/081439. Todas las muestras se analizaron usando el OneStep RT-PCR Kit (210212 Qiagen). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: temperatura de activación RT 95°C por 15 minutos, desnaturalización 94°C por 30 segundos, alineamiento 56°C por 30

segundos, extensión 72°C por 1 minuto con 30 segundos, por 35 ciclos y una Extensión Final de 72°C por 10 minutos (Termociclador Mastercycler pro (EPPENDORF) Cat 6325 000.013).

Cuadro 2. Región analizada en cada genoma viral y tamaño de producto en el PCR Multiplex.

Virus	Región Analizada	Tamaño de Producto pb
HVB1	gE	159
BPI3	M	199
BRSV	N	245
DVB	5'NTR	293

Se realizó la lectura mediante la separación por peso molecular en un gel de agarosa al 3%. La electroforesis (Camara de electroforesis Owl (Termo Scientific) Owl easy cast B1 y Fuente de poder (Termo Electron) EC105) se realizó en geles de agarosa al 3% (16500-500 Invitrogen), en TBE 1X, teñidos con bromuro de etidio (15585011 UltraPure™).

Controles de PCR

Como controles de la reacción se utilizaron virus de referencia *American Type Culture Collection* (ATCC) (VDVB cepa NADL, Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB) cepa Iowa, Herpes Virus Bovino tipo 1 (HVB-1) cepa Oregon y Para influenza Tipo 3 (PI-3), propagado en la línea celular MDBK en las condiciones antes mencionadas, sometidos a los mismos procesos de extracción de material genético en cada virus, estos se analizan por separado para comprobar su pureza mediante PCR, los productos obtenidos se clonaron con el kit InsTAclone PCR Cloning (K1213 Termo) en células competentes.

Línea celular

La línea celular utilizada en este trabajo fue riñón de bovino Madin Darby (por sus siglas en ingles MDBK; Madin-Darby Bovine Kidney), estas células se obtuvieron del ATCC (CCL-22 ATCC) y se analizaron previamente mediante RT-PCR para asegurar que estuvieran libres del VDVB contaminante, así mismo

éstas se cultivaron en botellas de 25 cm² (83.1810 Sarsted), utilizando para esto suero equino (SE) (16050122 GIBCO) al 10% todo esto se realizo en gabinete de bioseguridad (Nuair UN-425400).

Aislamiento viral co-cultivo

Una vez que las muestras de sangre se analizaron mediante la prueba RT-PCR para VDVB y se obtuvieron resultados positivos, se seleccionaron las muescas de oreja de las muestras correspondientes, se tomó una porción de aproximadamente 4mm en condiciones de esterilidad, la otra parte se siguió conservando a -80°C, la muestra se maceró en mortero estéril, este macerado se centrifugó recuperando el sobrenadante el cual se depositó en placas de 6 pozos (0030720113 EPPENDORF) con cultivos de la línea celular MDBK. Los cultivos celulares se mantuvieron confluentes en medio de cultivo D-MEM (12800-07 GIBCO) con SE (16050122 GIBCO) al 2% + antibiótico (penicilina/streptomocina/gentamicina = 100mg/ml-100mg/ml-50mg/ml) (15140 GIBCO), se incubaron a 37° C en una atmosfera del 5% de CO₂.

El efecto citopático se pudo observar hasta las 72 horas post infección, cuando este se presentó se recuperó el medio sobrenadante y las células aun adheridas (las monocapas), en tubos de fondo cónico de 15 ml (62.553.001 Sarsted), estos se sometieron a un proceso de sonicación (Electroporador, Branson/5510) durante 10 minutos para romper las células y liberar el virus. Una vez terminado este proceso, los tubos se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 minutos para recuperar el sobrenadante (Allegra X-30R BECKMAN CULTER).

Con el sobrenadante recuperado de los cultivos infectados, se realizaron pases posteriores en nuevas células, con las mismas condiciones, y repitiendo los mismos pasos durante las cosechas, este proceso (pases ciegos) se realizó hasta por tres ocasiones para dar oportunidad a una mayor replicación viral de pase a pase, para comprobar la presencia del VDVB en los pases, las células recuperadas se utilizaron para la obtención del ácido ribonucleico (ARN) viral, el cual se utilizó para la RT PCR. Paralelamente se utilizó un pozo inoculado con el virus de referencia (testigo positivo) y otro sin inóculo (testigo negativo) en cada uno de los pases con lo que se pudo validar el aislamiento viral.

Extracción de ARN por Trizol®

El sedimento de cultivos inoculados con muestras de biopsia de oreja se utiliza para determinar el crecimiento del VDVB, aunque también se utiliza para conocer la existencia de algún otro virus del CRB mediante la técnica de RT PCR, aunque en este caso se utiliza el método de extracción por Trizol® (15596-026 Invitrogen), el cual consta del uso de fenol para la degradación de tejidos, separación de ácidos nucleicos y precipitación del ARN con isopropanol (BAKR9037 J.T. Baker).

Genotipificación de los aislados del VDVB

1. Genotipificación por ensayo de discriminación alélica por PCR en tiempo real (qPCR).

Las muestras positivas por RT PCR punto final al VDVB se analizaron por PCR en tiempo real para determinación de genotipo en un ensayo de discriminación alélica con sondas Taqman, este trabajo se estandarizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Depto. de Genética de la FMVZ por el MVZ Mario Palma Zepeda.

2. Genotipificación por RT-PCR duplex en punto final de la región 5'NTR

Así mismo, se desarrolló y estandarizó un ensayo de RT PCR, el cual está en proceso de patente como kit para diagnóstico, esta reacción se realiza en una sola reacción de PCR, y es capaz de determinar el genotipo de los VDVB aislados en un solo paso mediante el diseño de iniciadores, con la capacidad para reconocer dos diferentes regiones de la 5' NTR, de las cuales una es específica para el G1 del VDVB y la otra específica para G2 del virus, identificándolos por la diferencia en el tamaño de producto de amplificación. Las condiciones de amplificación fueron las reportadas por el fabricante Qiagen OneStep usando una temperatura de alineamiento de 56°C por 30 segundos (Termociclador Mastercycler pro (Eppendorf) Cat 6325 000.013). Los productos esperados correspondieron a 67 pb para el G1 y 86 pb para el G2, la lectura mediante la separación por peso molecular mediante electroforesis (E-Gel®

Agarose System (Invitrogen) G6465) en geles prefabricados E-Gel® Ex Gel, 4% (G501804 Invitrogen).

Análisis de variabilidad nucleotídica

Para determinar que regiones del genoma viral son las que acumulan mayor cantidad de variaciones y así poder generar un mapa que indique qué regiones pueden caracterizar de mejor manera las cepas aisladas se realizó un análisis de variabilidad nucleotídica en el programa DnaSP V7 (Rozas, 2009), en el cual se incluyen 60 secuencias reportadas en las bases de datos del **National Center for Biotechnology Information** (NCBI) de ambos genotipos de VDVB, lo que corroboró lo mencionado en diferentes estudios anteriores que indica que la región que expresa para la proteína E2 es la que mayor variación tiene entre sus cepas tanto en el genotipo 1 como en el genotipo 2 comportándose ambos de manera similar.

Caracterización genética de aislamientos.

1. Genotipificación por análisis de la secuencia de la región 5'NTR.

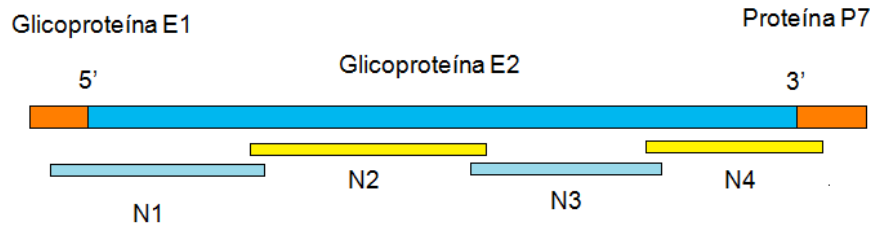
Las muestras que resultaron positivas al VDVB mediante el análisis de PCR multiplex, se procesaron nuevamente en un ensayo individual de RT PCR utilizando las condiciones de reacción del ensayo multiplex y los iniciadores específicos para el VDVB. Los productos de este ensayo se purificaron mediante electroforesis (E-Gel® Agarose System (Invitrogen) G6465) en geles prefabricados E-Gel® Size select, 2% (G661002 Invitrogen)., una vez purificados se enviaron a secuenciar.

2. Genotipificación por análisis de la secuencia del gen completo de la gE2

Se diseñaron iniciadores para el gen completo de la glicoproteína E2, este fue un ensayo de RT PCR con cuatro juegos de iniciadores. Se usó el kit OneStep RT-PCR Kit (210212 Qiagen). Las condiciones de amplificación fueron temperatura de activación RT 50°C 60 minutos, 95°C por 15 minutos, desnaturalización 95°C por 30 segundos, alineamiento 56°C por 30 segundos, extensión 72°C por 2:30 minutos, por 40 ciclos y una Extensión Final de 72°C por 7 minutos. Los cuatro fragmentos se identificaron como N1, N2, N3 y N4

cada fragmento se sobrelapa con el siguiente, esto para asegurar que se abarque todo el gen, la mezcla de reacción fue la siguiente: buffer 2 μ l, dNTP's 0.5 μ l, enzima 0.5 μ l, 1 μ l [10 μ M] y ARN (muestra) 5 μ l (Termociclador Mastercycler pro (Eppendorf) Cat 6325 000.013).

Figura 5. Diseño del ensayo para el análisis de la proteína E2.



Posteriormente se amplificó en su totalidad el gen que expresa la proteína E2, esto se realizó usando el kit OneStep RT-PCR Kit (210212 Qiagen). Las condiciones de amplificación fueron temperatura de activación RT 50°C 60 minutos, 95°C por 15 minutos, desnaturalización 95°C por 30 segundos, alineamiento 56°C por 30 segundos, extensión 72°C por 2:30 minutos, por 40 ciclos y una Extensión Final de 72°C por 7 minutos. Los cuatro fragmentos se indentificaron como N1, N2, N3 y N4 cada fragmento se sobrelapa con el siguiente, esto para asegurar que se abarque todo el gen, la mezcla de reacción fue la siguiente: buffer 2 μ l, dNTP's 0.5 μ l, enzima 0.5 μ l, 1 μ l [10 μ M] y ARN (muestra) 5 μ l.

Análisis filogenético.

Los productos de RT PCR de las cepas aisladas y purificadas se secuenciaron para determinar el genotipo y subgenotipo al que pertenecen, esto se logró secuenciado una porción de 293 pb de la región NTR 5'. Por otra parte también se secuenció la región completa que expresa para la glicoproteína E2, esto debido a la importancia que tiene durante la entrada del virus a la célula ya que un cambio en la secuencia, dependiendo la posición, la base, el tipo de aminoácido originado etc; puede significar una diferente conformación de la proteína traducido en la consecuente evasión de la respuesta inmune y por lo tanto una mayor o diferente antigenicidad.

Se llevó a cabo la secuenciación por el método de la terminación por dideoxinucleótidos de acuerdo a un protocolo establecido en nuestro laboratorio. Para ello, se realizó la reacción de secuenciación utilizando los iniciadores específicos para cadena en reacciones individuales y el reactivo “BigDye terminator” (4337455 Applied BioSystems). La reacción de secuenciación se llevó a cabo bajo las condiciones sugeridas por el fabricante. Los productos de secuenciación se purificaron, utilizando placas de filtrado (S384PCR10 Millipore). Los productos purificados analizaron en un “3130 Genetic Analyzer” (Applied BioSystems 3130/3130xl). Los archivos ABI se analizaron para generar los “contigs” necesarios para el ensamblado de los genomas completos. El análisis de las secuencias de ácidos nucleídos se llevó a cabo utilizando el programa GCG Wisconsin package (Accelrys Inc., San Diego, CA). Se determinó la entropía, variabilidad nucleotídica, distancias genéticas, distancias a nivel de aminoácidos y las posiciones seleccionadas positiva y negativamente en las regiones del genoma viral de interés. Para ello se utilizaron los programas DNAsp (<http://www.ub.edu/dnasp/>), HyPhy (<http://www.datamonkey.org/>), Phylip (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>), MEGA.

RESULTADOS

Análisis de Muestras

Se obtuvieron muestras de 533 animales en diferentes estados del país (Estado de Chiapas, Distrito Federal, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Oaxaca y Tabasco) y de distintos municipios, estas muestras fueron: sangre completa con anticoagulante (Heparina), sangre completa sin anticoagulante, hisopados nasales y muescas de orejas. De estas muestras se analizaron las de sangre completa mediante RT-PCR para la región 5' NTR para determinar la presencia del genoma del VDVB, los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3%, esperando un peso de 293 pb, obteniendo como resultado 165 muestras positivas.

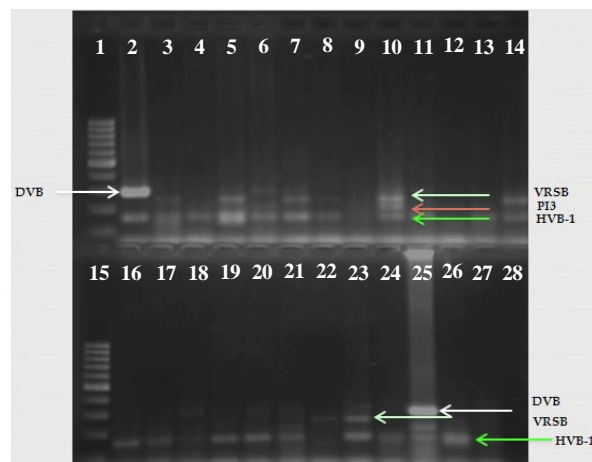


Figura 6. PCR Amplificación múltiple. Pozos 1 y 15 Marcador de peso molecular de 100 pb (SM0241 Invitrogen), 2 – 24 Muestras de campo; pozos 25 y 26 Controles positivos; 27 y 28 controles negativos. Las flechas blancas señalan la banda obtenida para las muestras del VDVB las cuales tienen un peso molecular aproximado de 293 pb. Las flechas azules indican el producto esperado de las muestras positivas a VRSB. Las flechas anaranjadas señalan los productos obtenidos en muestras positivas a PI-3. Las flechas verdes señalan los productos obtenidos de HVB-1.

Al hacer el análisis de los datos obtenidos del PCR múltiple obtuvimos los datos presentados en el cuadro 3. Estos representan información muy valiosa aunque para efectos de este trabajo no son muy relevantes, lo que sí es

importante es que el VDVB se identificó en 170 muestras lo que significa el 31.7 %, en Guerrero y en Hidalgo, no se pudo determinar la presencia de VDVB, atribuyéndolo inicialmente a la cantidad de muestras, además de que solo se obtuvieron muestras de sangre, haciendo falta las de muesca de oreja.

Localidad	DVB	BHV1	BRSV	PI3
Chiapas	14	44	0	100
D.F.	26	0	0	0
Edo México	23	28	0	24
Guerrero	0	7	0	21
Hidalgo	0	4	0	0
Jalisco	30	15	0	23
Oaxaca	6	11	6	0
Tabasco	71	46	3	64
Total	170/533	155/533	9/533	232/533
%	31.89	29.08	1.68	43.52

Cuadro 3. Distribución de muestras positivas por estado y por agente infeccioso

El análisis final de los resultados de RT-PCR multiplex realizado a todas las muestras obtenidas se observa claramente que el virus predominante fue y PI-3 con 232 muestras positivas, pero cuando se realiza el análisis de las co-infecciones encontradas mediante este método podemos observar la predominancia del VDVB que aparece en casi todas las co-infecciones encontradas ver Figura 7.

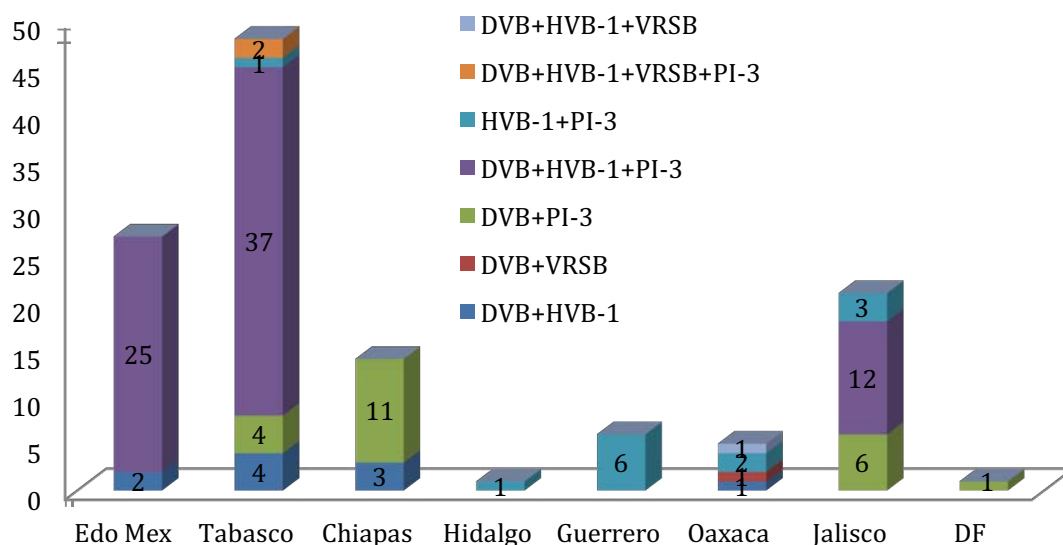


Figura 7. Número de co-infecciones por estado de la República y las combinaciones encontradas en el presente estudio.

Aislamiento viral

De las muestras de leucocitos que resultaron positivas al VDVB en la RT-PCR, se utilizaron las muescas de orejas correspondientes a las muestras de sangre antes analizadas. A partir de estas se realizó el aislamiento viral mediante la técnica de co-cultivo en cultivos celulares, en la línea MDBK (previamente analizadas para corroborar la ausencia del VDVB), en placas de 6 pozos, las cuales se incubaron por 3 días o hasta la observación de efecto citopático.

Se realizaron pases ciegos hasta la observación de efecto citopático (ECP) Figura 8, algunas muestras presentaron efecto desde el primer pase. De los pozos con ECP y sin ECP se recuperaron tanto células como el medio de cultivo, estos se centrifugaron a 3000 rpm 10 min, del sedimento se realizaron extracciones de ARN esto para confirmar por RT-PCR la presencia del genoma del virus de diarrea viral bovina detectando o no la presencia de alguna cepa no citopática. El medio de cultivo sobrenadante se utilizó para la replicación del virus por lo que se conservó en congelación a -80°C .

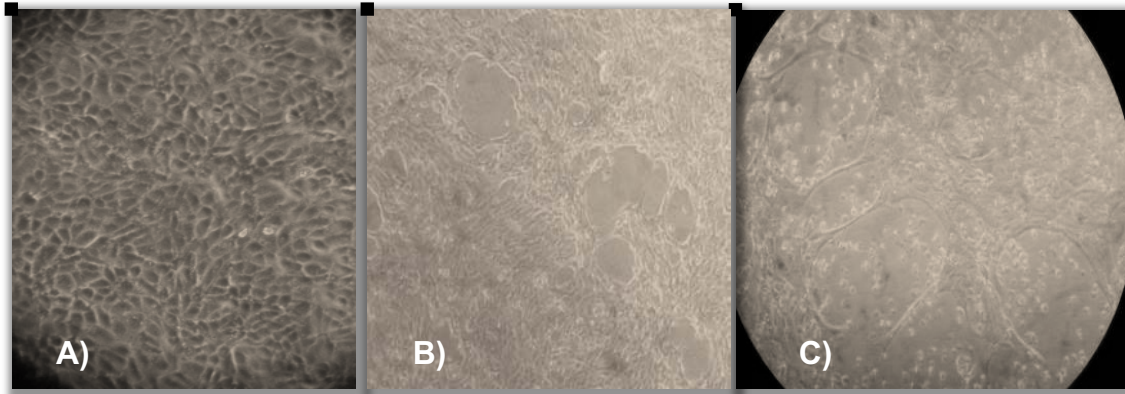


Figura 8. A) Células MDBK normales. B) Células MDBK 72 horas post inoculación con VDVb cepa NADL. C) Células MDBK 72 horas post inoculación con muestras positivas por RT-PCR a VDVb.

De la totalidad de muestras positivas a VDVb en el primer ensayo de RT-PCR se seleccionaron solo algunas muestras para llevar a cabo su aislamiento, esto de acuerdo con el lugar de origen de la muestra, (solo 1-3 muestras positivas provenientes de un mismo hato). Se tuvieron 9 aislamientos del Estado de México, 16 de Tabasco, 10 del Distrito Federal, 5 de Oaxaca, 10 de Chiapas y 11 de Jalisco.

	Chiapas	DF	Jalisco	Edo. Mex	Oaxaca	Tabasco	Total
Muestras	162	80	41	43	33	149	508
Positivas	14	26	30	23	6	71	170
Negativas	148	54	11	20	27	78	338
Aislamiento	8	10	11	9	5	16	59

Cuadro 4. Distribución de Aislamientos de VDVb por estado.

Genotipificación por PCR

1. Genotipificación por qPCR (ensayo de discriminación alélica)

Como una primera aproximación para definir el genotipo de los aislamientos virales, 27 muestras se analizaron por el ensayo de discriminación alélica con el uso de sondas Taqman, mediante PCR en tiempo Real (q-PCR). Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Depto. de Genética de la FMVZ, y lo realizó el MVZ Mario Palma Zepeda, los resultados mostraron 23 de ellas positivas al G2, 2 positivas a G1 y 2 muestras positivas a los dos genotipos.

2. Genotipificación por RT-PCR duplex en punto final de la región 5'NTR

Una vez que se estandarizó este ensayo, se analizaron 59 muestras. Los resultados mostraron 15 muestras positivas para VDVB G1, 33 para VDVB G2 y 11 muestras en las que se obtuvo co-infección de virus con G1 y G2.

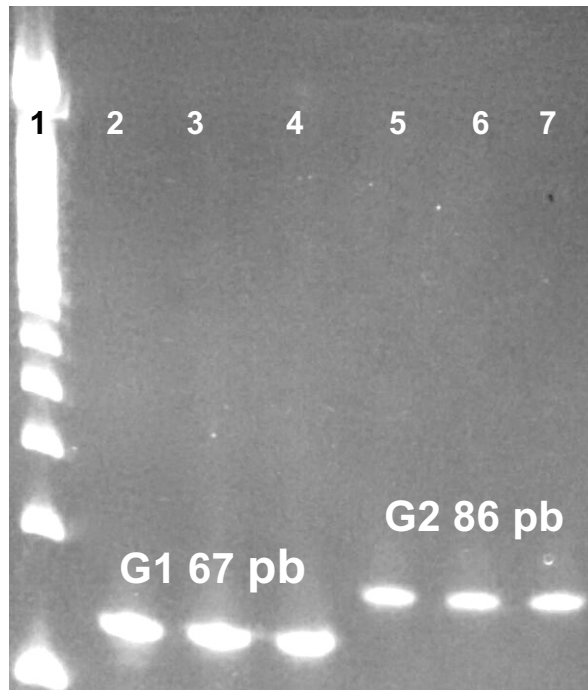


Figura 9. Gel con productos de RT-PCR para genotipificación. El marcador de peso molecular (50 pb) en el carril 1, los tres siguientes (2, 3 y 4) pozos contienen productos de RT-PCR correspondientes al G1 67 pb, en los carriles 5, 6 y 7 productos de RT-PCR correspondientes al G2 86 pb.

La disposición geográfica de los genotipos virales encontrados se observa en la gráfica de la figura 10.

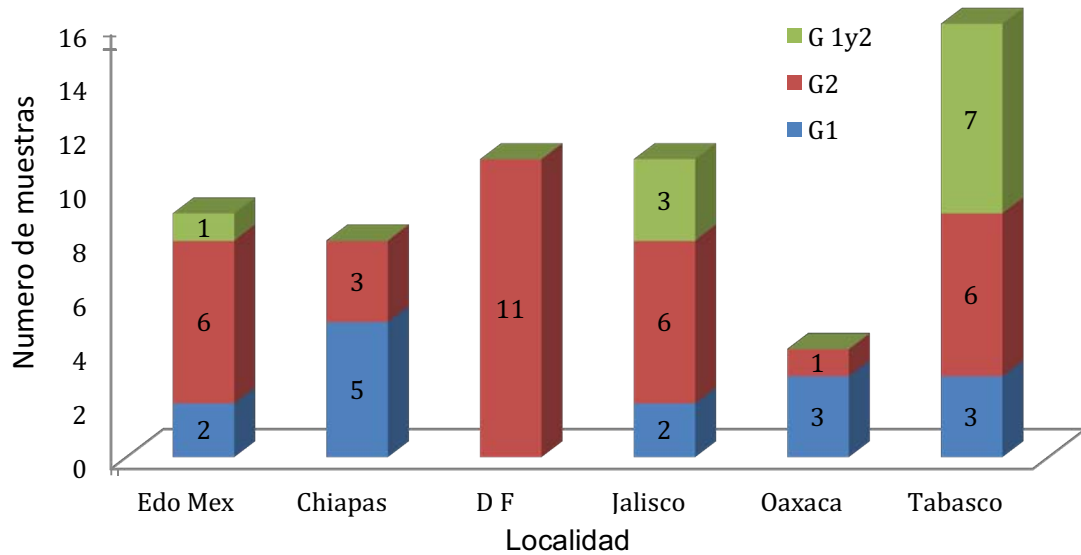


Figura 10. Ubicación Geográfica de Aislamientos del VDVB G1 y G2.

Análisis de Variabilidad Nucleotídica

Se realizó un análisis de variabilidad nucleotídica comparando las secuencias completas reportadas en el Gen Bank. Para el genotipo 1, se incluyeron 33 secuencias completas y para el G2 se incluyeron 27 secuencias completas, obteniendo los resultados presentados en la figura 11. Mediante este análisis se logró determinar y graficar el grado de variabilidad genética que presenta cada región de la poliproteína viral donde se encontró que la región que presenta mayor variación es la región que expresa para la glicoproteína estructural E2 del VDVB tanto para G1 como para el G2, esto puede ser explicado por la gran presión de selección que está sometida esta proteína por parte del sistema inmune del hospedero.

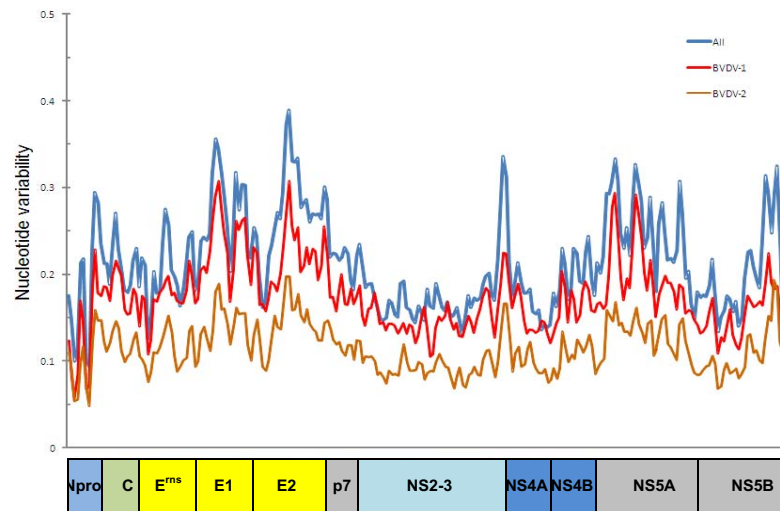


Figura 11. Análisis de Variación Nucleotídica, realizado en el programa DNASp, mediante el algoritmo Sliding Window, con la totalidad de las secuencias completas reportadas en la base datos Genbank del VDV B. La línea azul representa la suma de la variación genética del VDV B Genotipo 1 y 2. La línea roja representa la variación genética que presenta VDV B Genotipo 1. La línea café representa la variación genética del VDV B Genotipo 2.

3. Genotipificación mediante la secuenciación de productos de 5' NTR de los virus aislados

Los productos de RT PCR para la región 5' NTR de una muestra de Tabasco, 13 de Chiapas y 6 de Oaxaca, se purificaron mediante el uso de E-gel® size select™. La figura 12 muestra una imagen representativa de los geles con los productos de amplificación de las muestras de la región NTR 5' con banda única.

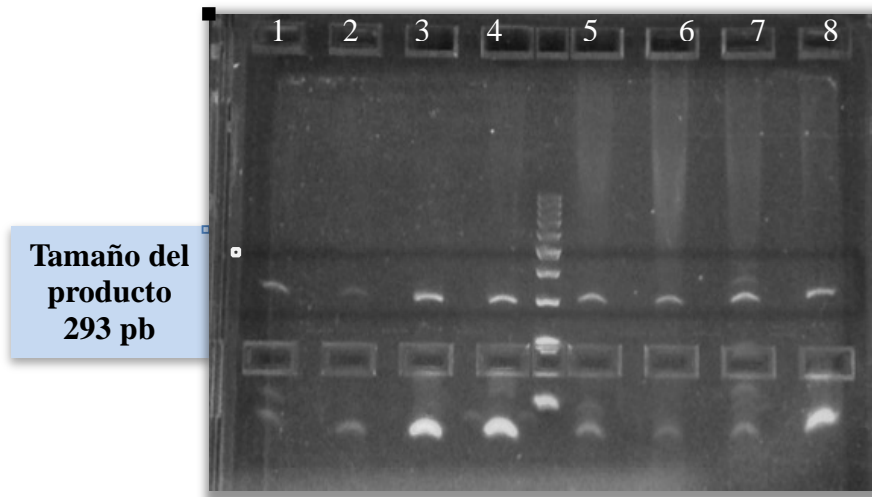


Figura 12. Purificación de productos para secuenciación: Pozos 1-8 contienen muestras positivas a VDVB, en el recuadro se observan los productos justo antes de purificar.

Se enviaron a secuenciar mediante secuenciación tipo sanger, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Una vez que se contó con las secuencias se realizó el análisis, primero se editaron mediante Seqman de LasergenTM, una vez que se obtuvieron las secuencias editadas estas se alineararon mediante Mafft v7.221®. El análisis filogenético se realizó utilizando MEGA 6, las secuencias obtenidas de los productos de 5' NTR y otras secuencias representativas de los genotipos 1 y 2 del VDVB reportadas en Gene Bank fueron utilizadas. De las 20 muestras secuenciadas solo se pudieron obtener 16 secuencias de buena calidad de las que 13 fueron caracterizadas como G2 y 3 como G.

Por otro lado utilizando el software www.pns-software.com (Giangaspero et al., 2013) se pudo determinar el genotipo y subgenotipo de cada uno de los aislados virales.

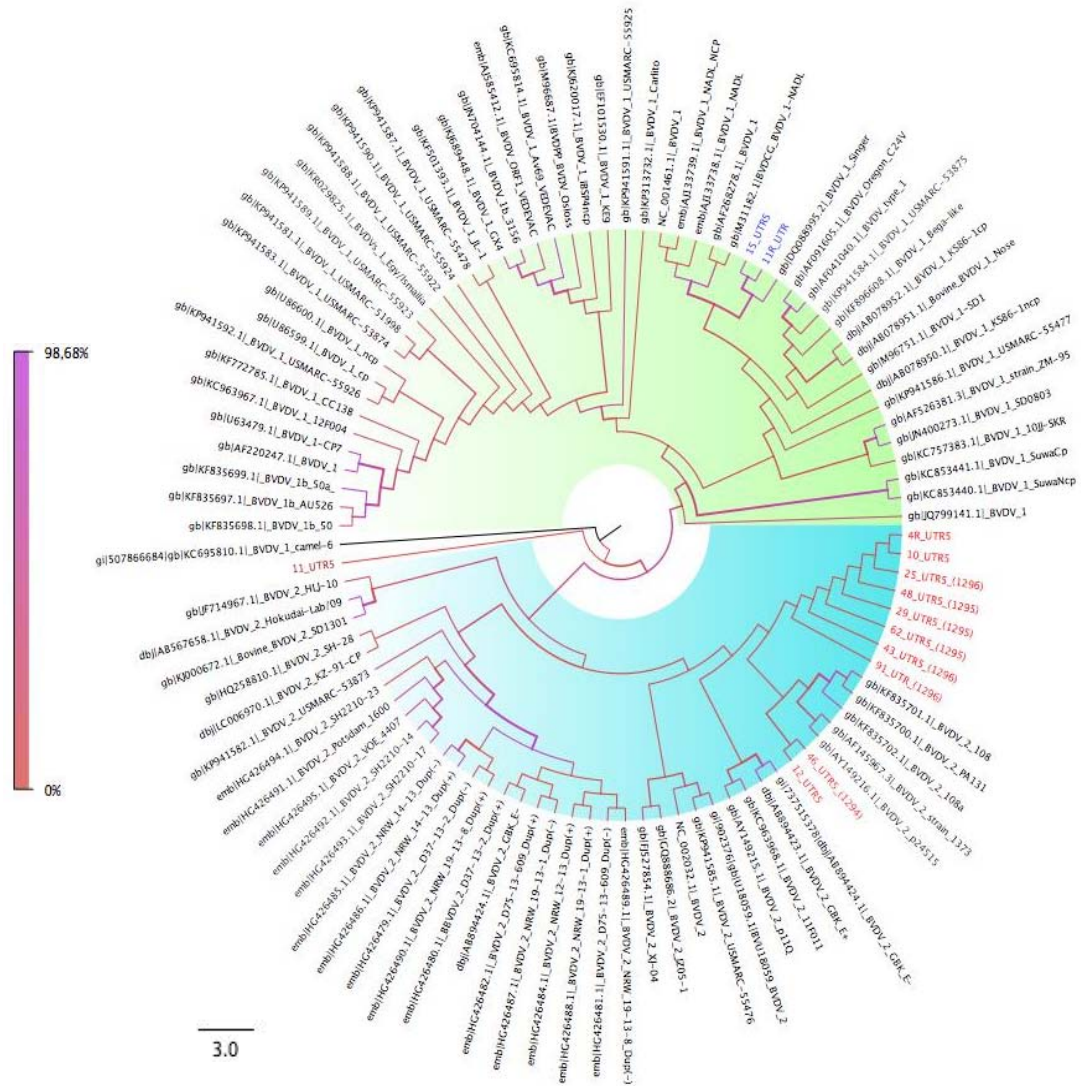


Figura 13. Análisis filogenético utilizando 5' NTR. Se muestran cepas del VDVb representativas de los dos genotipos y los diferentes subgenotipos. Se utilizaron las secuencias de la región 5' NTR para ilustrar la diversidad máxima dentro de un genotipo. El árbol neighbor joining se construyó utilizando máxima probabilidad compuesta por distancia de nucleótidos utilizando MEGA6 y 1000 repeticiones para bootstrapping. (Rossi et al., 2015).

4. Genotipificación por análisis de la secuencia del gen completo de la gE2

En la reacción de RT PCR para las regiones N1, N3 y N4 el ensayo se realizó sin mayor problema, obteniendo los productos de manera directa, en cambio para la región de la glicoproteína E2 correspondiente a nuestro fragmento N2 el resultado no fue el esperado, no se obtuvo producto de amplificación. Debido a esto se analizaron nuevamente secuencias reportadas en GeneBank de la glicoproteína con lo que se pudo observar que la región correspondiente a N2 corresponde a una región hipervariable de la glicoproteína por lo que se tomó la decisión de hacer el diseño de los nuevos iniciadores específicos para cada genotipo, realizando el ensayo en un solo paso de forma similar a como se llevó a cabo el ensayo de genotipificación, obtenido de esta manera el amplicón de la región de N2.

Fragmento de la glicoproteína E2	Tamaño de los Amplicones
N1	490
N2	390
N3	340
N4	510

Cuadro 5. Tamaño de amplicones, N1, N2, N3 y N4 de la gp E2

Para la obtención del gen completo que codifica para la glicoproteína E2 se realizaron 4 reacciones de PCR, en cada una de las reacciones se obtuvo un producto correspondiente a una región de la glicoproteína, una vez que se obtuvieron los cuatro amplicones de las cuatro regiones correspondientes en cada aislamiento, estos se purificaron por electroforesis en geles prefabricados E-Gel® Size Select™, por medio de un proceso de Electroforesis, posteriormente se realizó su análisis en el equipo Bioanalyzer (2100 Agilent), para determinar la calidad del material genético para secuenciación.

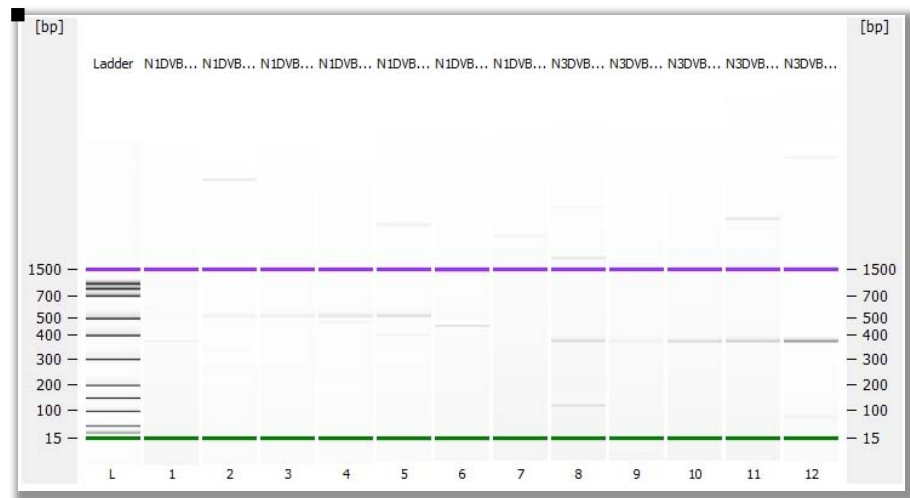


Figura 14. Análisis de la calidad de los productos de RT-PCR de la glicoproteína E2 purificados para secuenciar, realizado en el equipo Bioanalyzer (2100 Agilent). Carril L Marcado de peso molecular, carriles 1-7 muestras purificadas de N1, tamaño de producto 500 pb, carriles 8-12 muestras purificadas de N3, tamaño de producto 380 pb.

Las muestras se enviaron a secuenciar tanto en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, como en LANGEBIO, CINVESTAV.

En este proceso se obtuvieron 7 secuencias del gen completo, que codifica para la glicoproteína E2 de diferentes muestras, las secuencias obtenidas de las diferentes secciones del gen se ensamblaron y editaron, mediante el uso SeqMan (Lasergen™).



Figuran 15. Ensamblado y edición de secuencias para la obtención de la secuencia completa del gen que codifica para la glicoproteína E2, Programa SeqMan (Lasergen™).

Análisis filogenético de la región del gen codificante para la proteína E2

A partir de las secuencias obtenidas mediante PCR de la glicoproteína E2, se realizó el ensamblado y la edición, con la paquetería SeqMan de Lasergen™, posteriormente fueron sometidas a un alineamiento múltiple con programa Mafft v7.221®. El análisis filogenético las secuencias alineadas se llevó a cabo utilizando MEGA 6, incluyendo secuencias representativas del genotipo 1 y genotipo 2 reportadas en el GeneBank, analizados por métodos bioinformáticos, demuestran que nuestros aislamientos corresponden a VDVB G2, estos al generar el mapa filogenético se puede observar que están relacionados con aislamientos realizados en Estados Unidos y Canadá así como con reportes realizados en Sudamérica.

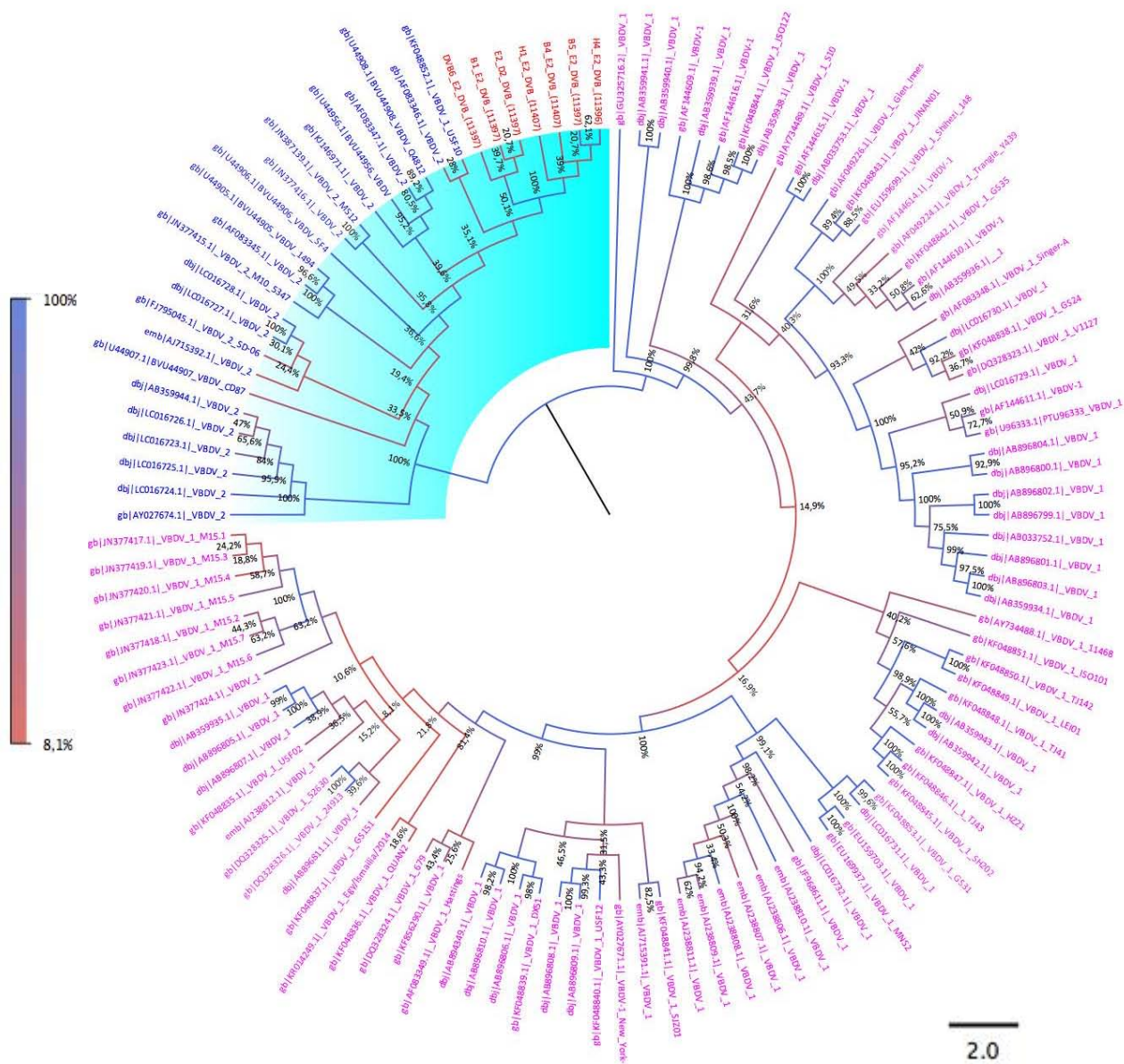


Figura 16. Análisis filogenético de la gp E2. En rosa se pueden observar las muestras correspondientes al G1, en azul se observan las muestras correspondientes al Genotipo 1. El árbol se elaboró en el programa Mega6 utilizando el modelo Neibor Joining Tree, se estimó el mejor método de sustitución nucleotídica y se realizó utilizando modest tes y al menos 1000 repeticiones.

DISCUSION

Virus del CRB.

En el presente trabajo se utilizó un sistema de PCR y RT-PCR multiplex el cual fue de gran importancia debido a que los animales muestreados presentaban signos clínicos sugerentes de enfermedad respiratoria, sin embargo, no se conocía que microorganismo estaba interviniendo en el proceso de la enfermedad de cada animal, se sabe que los virus más importantes asociados al CRB en bovinos son VDVB, HVB 1, VRSB y PI 3, (Roshtkhari et al., 2012). Mediante esta herramienta se pudo determinar si los signos clínicos presentados por los animales al momento de muestrear estaban relacionados con alguno de los virus del CRB y en especial con VDVB. Esta técnica puede ser muy útil en el área de diagnóstico ya que por un lado es capaz de identificar los cuatro virus del CRB en un solo paso, esto en el caso de que haya co-infección y en segunda es un método rápido de realizar, muy sensible y capaz de detectar animales persistentemente infectados en el caso de VDVB sin necesidad de una variante específica para este propósito, esto debido a que es capaz de determinar la presencia del virus mediante la amplificación de una región del genoma. (Horwood and Mahony, 2011). Los primeros datos obtenidos en el presente estudio fueron las co-infecciones de virus del CRB, esto es un dato muy importante ya que esto nos indica que estrategia debemos llevar a cabo para el control de este problema en el campo mexicano.

También se pudo determinar la presencia del VDVB en ganado de diferentes regiones del país tanto productor de leche como de carne y doble propósito. Comprobándose de esta manera la presencia del VDVB en México tal como se menciona en los estudios realizados por (Segura-Correa et al., 2010, Solis-Calderon et al., 2005) donde se reporta entre el 15 y 16 % de seropositividad. En este estudio se obtuvieron 31.7 % de muestras positivas por RT PCR para la región 5' NTR en el ensayo multiplex, este dato es demasiado alto en comparación con otros estudios realizados en otros países donde reportan 0.36 %, 5% (Weber et al., 2014) de animales positivos en PCR, debido

a que los animales muestreados fueron seleccionados por la presencia de signos respiratorios, así mismo los ranchos de donde provienen las muestras no vacunan de manera sistemática contra CRB.

El VDVB es un virus con una elevada capacidad de mutar debido a que la ARN polimerasa dependiente de ARN que utiliza para llevar a cabo su proceso de replicación, tiene una baja eficiencia al incorporar nucleótidos al genoma, generando genomas con cambios en sus secuencias, esto aunado a la incapacidad de esta misma enzima de corregir errores de esta misma manera existe un fuerte porcentaje de posibilidades de que sufra un proceso de recombinación (Becher and Tautz, 2011). Esta situación desemboca en la generación de variantes, cuando estos cambios se producen en una región en la que se expresa una proteína la cual cumple funciones importantes durante la replicación viral, esta puede perder su función dando origen a una partícula viral no viable, por este motivo estas regiones permanecen como conservadas a lo largo del genoma viral. Las regiones más variables de un virus suelen ser aquellas que están sometidas a una fuerte presión de selección ya que suelen estar expuestas y son blancos de los anticuerpos neutralizantes, corresponden a proteínas que al tener un cambio en el genoma este puede dar origen a una proteína con capacidades diferentes a las que tiene el virus original, y que de alguna forma evitan que estas proteínas sean reconocidas por los anticuerpos, normalmente los cambios en estas proteínas no propician pérdida de función. En este proyecto mediante el análisis de variabilidad nucleotídica se puso en evidencia el grado de variación que existe entre los genomas reportados en la base de datos del NCBI, estos genomas corresponden a aislamientos realizados en todo el mundo, de la gráfica presentada anteriormente podemos resumir que las regiones con mayor variabilidad son aquellas proteínas estructurales que permanecen expuestas, las cuales participan en el proceso de unión al receptor celular, para su posterior internalización a la célula esto concuerda con la gran gama de estudios que refieren que la proteína E2 es la proteína más variable del virus, además de ser la más inmunodominante del virus por lo que puede ser candidata para el desarrollo de vacunas de subunidad (Pecora et al., 2015, Kalaycioglu, 2007).

Genotipificación:

Como se mencionó anteriormente el VDVB tiene un genoma muy variable, motivo por el cual al hacer un análisis en el genoma puede haber omisiones al tratar de identificar virus presente en una muestra. Por lo que en el presente estudio se abordó la genotipificación mediante el uso de diversas estrategias:

1. Genotipificación mediante qPCR mediante sondas Taqman.

Los resultados obtenidos mediante este método demostraron que la presencia del VDVB G2 es mayor que la de VDVB G1, por otro lado también fue posible determinar la presencia de co-infecciones virales entre G1 y G2, en general los resultados obtenidos en este ensayo nos orientan sobre la proporción de los genotipos circulantes. Esta técnica es bastante confiable y específica además es capaz de cuantificar la concentración viral en una muestra, lo cual puede ser aplicado para otros fines como titulación viral, evaluación de respuesta inmune o estatus de la enfermedad, pero la limitante es que los reactivos utilizados pueden llegar a ser caros en comparación con un ensayo de PCR punto final.

2. PCR duplex

O'Neill y colaboradores en 2014, (Weber et al., 2014, O'Neill et al., 2014) reporta una mayor frecuencia del VDVB G2 con relación al VDVB G1 esto en Irlanda, correspondiendo con nuestros hallazgos en donde con nuestros resultados de la genotipificación por RT PCR dúplex encontramos que la presencia del G2 del VDVB fue del 55.9 %, la cual fue mayor que VDVB G1 en donde el porcentaje correspondiente fue 25.4 %, por último cabe mencionar que en los aislamientos realizados se determinó la presencia de co-infecciones por VDVB G1 y VDVB G2 este hallazgo se realizó en un total de 11 aislamientos lo que corresponde al 18.8 % es interesante ver como la mayor parte de nuestros aislamientos corresponden a muestras provenientes de producciones ganaderas dedicadas a la producción de pie de cría, lo que habla de que los animales que se tienen en estas son animales de alta estima con un gran valor genético, este tipo de ganadería introduce animales al país para aumentar los estándares productivos, sin embargo muchas veces no se estima las implicaciones que esto conlleva en cuestiones de salud animal, teniendo como resultado la introducción de

enfermedades infecciosas no existentes o cepas diferentes de microorganismos circulantes en el país.

Con las dos técnicas anteriores podemos decir a qué genotipo pertenecen los aislados, pero no aportan información respecto al subgenotipo de los aislados del VDVB. Por lo que, se procedió al análisis de la secuencia de la región 5'NTR y la secuencia completa del gen que codifica para gpE2

En diferentes estudios se ha mencionado la presencia del VDVB en todo el mundo, debido a su capacidad de adaptación en diferentes especies animales, en estos estudios se menciona la variabilidad antigénica de los virus y que sobre todo esta es mayor cuando una cepa es introducida a una región en la cual predomina otra cepa con respecto a esta. Estos estudios respaldan la predominancia de ciertos genotipos sobre otros en una región específica así la distribución del genotipo 2 está mayormente referenciado en América, sobre todo en el norte del continente (Kalaycioglu, 2007) que es donde se realizó el primer reporte de esta cepa, así mismo se destaca que esta cepa es mucho más antigénica que el VDVB genotipo 2 aislado en Europa, en donde en algunas zonas se encuentra erradicado el virus (Presi et al., 2011, Oguzoglu et al., 2010). Las cepas del VDVB Genotipo 1 a y b se reportan con mayor frecuencia en todo el continente americano desde Canadá hasta Argentina (Vilcek et al., 2003, Pecora et al., 2014). Europa es una de las regiones con mayor número de variantes de este virus, tan solo en Italia se han reportado al menos 17 subgenotipos del VDVB G1 donde se propone en un estudio realizado en 2014 la presencia de tres subgenotipos nuevos 1r, 1s y 1t (Giammarioli et al., 2015).

En el presente estudio el análisis de secuencia de la región 5'NTR mostró una mayor presencia del G2 sobre el G1, esto es importante resaltar debido a que marca una pauta hacia donde debemos de dirigir las estrategias de vacunación, por lo menos pensando que las vacunas utilizadas en México deben contener ambos genotipos. Aunado a esto es importante mencionar la cantidad de coinfecciones encontradas, lo cual es un indicativo claro de que en varios estados los dos genotipos están coexistiendo, lo cual aumenta la exigencia hacia las vacunas utilizadas en México.

El análisis de secuencia de la gpE2 confirmó los resultados generados con los análisis realizados para la región NTR 5',

Con ambas técnicas pudimos comprobar los resultados obtenidos por el ensayo de PCR duplex que demostró la predominancia del genotipo 2 sobre el genotipo 1 del VDVB aunque no se logró abarcar todo el territorio nacional, se pudo contar con muestras de regiones con una fuerte actividad ganadera, garantizando de esta manera contar con un amplio panorama de la arquitectura viral circulante en México.

Como se mencionó anteriormente la variación entre el genotipo 1 y el genotipo 2 es mayor (60 %) que la variación que existe entre VDVB y *Border Disease Virus* (BDV) (90 %), esto resalta la importancia que cobra el poder diferenciar ambos genotipos durante un diagnóstico (Kalaycioglu, 2007), ya que en la mayoría de los casos las pruebas de diagnóstico comerciales se desarrollan a base de anticuerpos pero estos métodos están sujetos a la estabilidad del virus, por un lado la cepa con la que se desarrollan estos métodos son aisladas en otras regiones del mundo, por otro lado depende del tipo de cepa que circula en esta región la cual puede ser una cepa no citopática incapaz de favorecer la producción de anticuerpos (Giammarioli et al., 2015), representando esto una barrera para un diagnóstico eficaz y aunado a la variabilidad antigénica entre genotipos, se crea un amplio margen de error en el que pueden caer este tipo de diagnósticos, esto lleva a la perpetración de cepas circulantes, por lo que es mejor utilizar un método de diagnóstico, el cual se realizó a base de regiones conservadas en el genoma que disminuyen el riesgo de fallo en el diagnóstico favoreciendo el desarrollo de un mapa de prevalencias.

Además de identificar que genotipo circula en una región, es de gran importancia identificar que subgenotipos se encuentran en ésta. Como se discutió anteriormente la importancia de genotipificar por la variabilidad antigénica que existe entre genotipos, es mucho más importante identificar esta variación a nivel de subgenotipos ya que existen cepas del mismo genotipo pero con subgenotipo distinto en los cuales la distancia antigénica puede favorecer a fallas de la vacunación, estos problemas son imperceptibles cuando se

desconoce la naturaleza del virus pero se vacuna contra ambos genotipos del VDVB. Actualmente, la mayor parte de las vacunas comerciales se elaboran con antígenos obtenidos en países diferentes a los que se aplica, en estos casos se garantiza la protección contra genotipo 1 y 2 del VDVB (Kalaycioglu, 2007), pero en muy pocos casos se determina la efectividad de la vacuna ni que cepas circulan, esto aunado al hecho de que la mayoría de estas vacunas se desarrollan con virus atenuados representando una problemática mayor cuando se analiza la posibilidad de reversión a patógeno de estas mismas cepas y si esta cepa no existía en esta región llegándose a establecer como una nueva cepa establecida con los riesgos que implica esto.

En el presente trabajo se estudiaron cepas de diferentes regiones y de diferente fin zootécnico, el conocimiento de los virus circulantes garantiza una vacunación efectiva, así mismo mediante el análisis de las secuencias del gen que expresa para la proteína E2 de los virus aislados se realizó análisis filogenético para determinar las relaciones de las cepas y conocer el estatus de estos virus en México, con la finalidad de que en un futuro la información generada en nuestro estudio ayude a desarrollar vacunas con subunidades virales que sean capaces de proteger contra una mayor gama de cepas del VDVB abarcando G1 y G2 y sus diferentes subgenotipos, ya sea tratándolo de hacer en una sola vacuna o desarrollando vacunas específicas por región.

En el momento de hacer el análisis de los datos de genotipificación con respecto a su origen geográfico no se pudo hacer alguna inferencia en cuanto a su distribución ya que se pudo determinar que aunque hay en la mayor parte de los estados analizados una predominancia de genotipo 2 sobre genotipo 1, en todos los casos existen ambos y en la mayor parte hay co-infecciones en un solo animal, esta situación se puede explicar muy fácilmente ya que como se comentó anteriormente la producción bovina para carne y leche es la segunda actividad ganadera más importante en el país, entendiéndose que esta actividad se desarrolla en todos los estados. México no es un país productor de animales con buena genética, por lo que en muchos casos los ganaderos adquieren animales con genética superior en otros países siendo por la cercanía Estados Unidos el

principal proveedor de estos, lo que implica un riesgo de introducción de cepas de VDVB diferentes a las que se encuentran en nuestro país.

Por otro lado las características de la actividad ganadera pueden favorecer la diseminación de estas cepas introducidas. La actividad ganadera se divide en varios fragmentos en donde la primera y principal actividad es la generación de animales de recambio, estos animales son los que se introducen a un hato para sustituir animales de avanzada edad o que ya cumplen de manera eficaz con su rol dentro de este, esto puede ser tanto en ganadería de carne como de leche. En la ganadería de producción de carne se pueden identificar dos principales actividades, la primera de estas es la producción de becerros para engorda y la segunda la engorda de becerros hasta su venta como carne, esta última es la que tiene mayor relevancia por lo siguiente: en México existen tianguis ganaderos en los cuales muchos ganaderos llevan sus animales a la venta, punto donde los ganaderos que se dedican a la engorda compran nuevos animales para la introducción a esta actividad. En muchos casos estos ganaderos provienen de diferentes partes de la República trasladando de esta manera cepas virales de un estado a otro, explicándonos así la presencia de los dos genotipos en los estados analizados, llevándonos a pensar en una situación similar en los demás estados, sin embargo esto deberá ser comprobado en estudios posteriores.

Cuando se habla de la variación dentro de un genotipo está relacionada con los cambios que suelen ocurrir a nivel de subgenotipos los cuales se identifican a partir de regiones variables, en este caso se utilizó la proteína E2 debido a que en el análisis de variabilidad nucleotídica se identificó como la proteína más variable, aunque muchos de estos cambios que suelen ocurrir en el genoma pueden ser silenciosos también pueden ocurrir aquellos que favorezcan un cambio en las características de esta proteína confiriendo ventajas frente a la cepa de origen, las más importantes se refieren a la evasión de la respuesta inmune, por lo que esta proteína es la que con mayor frecuencia se toma como candidato para la generación de vacuna. Por otro lado el análisis de esta proteína mediante las herramientas utilizadas en este trabajo puede ser de gran ayuda para generar un mapa epidemiológico el cual se pueda utilizar como

un mecanismo para identificar cepas establecidas en una región geográfica de cepas introducidas llevando a tomar acciones para prevenir problemas económicos en el ámbito ganadero desencadenados por la salud animal (Kalaycioglu et al., 2012).

El análisis de la región que expresa para la proteína E2 se realizó a partir de la generación de fragmentos de esta proteína de entre 350 y 500 pb, los cuales se sobreponen en los extremos para así abarcar la totalidad de esta proteína. Durante este proceso, se pudo determinar una región altamente variable de la proteína que se encuentra a nivel del segundo fragmento, en este proyecto se identificó como N2-E2, esto se pudo determinar debido a que al momento de realizar la PCR para la obtención del producto de esta región con un primer juego de iniciadores, no fue posible obtener el producto, situación por la cual se llevó a cabo un nuevo diseño de iniciadores para esta región, pero en este caso específicos por genotipo, en estudios anteriores se reportan una región muy variable de esta proteína que se encuentra entre las posiciones de nucleótidos 2405-3149 (Stokstad et al., 2004). Estos fragmentos al ser secuenciados, reafirmaron las teorías de la gran variabilidad de esta proteína teniendo que el mayor número de cambios se dan en la primera mitad de esta proteína correspondiente a la región amino terminal (Stokstad et al., 2004, Kalaycioglu et al., 2012). El haber obtenido estas secuencias será de gran relevancia en trabajos posteriores no solo para tener un archivo mediante el cual se pueda generar un mapa epidemiológico del VDVB en México y poder identificar cepas circulantes establecidas de las introducidas esto mediante el análisis filogenético de las secuencias comparándolas con las reportadas en otras partes del mundo (Giammarioli et al., 2015, Oguzoglu et al., 2010, Pecora et al., 2014), además puede ser de gran utilidad en la generación de vacunas recombinantes con subunidades mucho más seguras y eficaces que las que se comercializan actualmente, las cuales son fabricadas con virus aislados en otras regiones del planeta (Loy et al., 2013), así mismo se pueden desarrollar pruebas de diagnóstico serológico para determinar la presencia de anticuerpos contra la proteína E2.

En el presente trabajo se realizaron actividades para la caracterización genética de cepas del VDVB circulantes en México, esto mediante el análisis de la región conservada 5' NTR y la región hipervariable que expresa para la proteína E2 que se realizó aplicando las técnicas de RT-PCR, secuenciación y análisis bioinformático, demostrando la gran importancia y la necesidad de implementar métodos moleculares de manera sistemática en el estudio de las diferentes enfermedades que representan un problemática social y económica en el país. Así mismo, este trabajo puede ser la base para la implementación de mecanismos que puedan ser utilizados por laboratorios productores de biológicos veterinarios para el desarrollo de vacunas con tecnología recombinante, esto debido a que se logró obtener tanto las secuencias como los genes completos de una de las proteínas más antigénicas del VDVB y esto no solo de una cepa si no de varias cepas aisladas las cuales pertenecen a los dos genotipos de este virus en el país. Esto tiene muchas ventajas con respecto a las vacunas de uso convencional pues en ellas normalmente se incluyen virus vivos atenuados de los genotipos 1 y 2, subgenotipos a y b, pero de virus aislados en otras regiones del mundo, los cuales no se sabe con exactitud el grado de protección que pueden tener contra los virus circulantes en el país.

CONCLUSIONES

En los análisis realizados a la totalidad de muestras obtenidas en los diferentes estados del país se pudo determinar la presencia de co-infecciones del VDVB con otros virus del CRB siendo la más fuerte la presentada con PI-3 y posteriormente la observada con HVB-1, también se determinó que el virus que mayor presencia tiene es PI-3, lo cual es un indicativo de la necesidad de hacer mas estudios enfocados a los demás virus y no solo al VDVB.

Este estudio es un precedente para el análisis de la situación de los virus del CRB, en especial para el virus de VDVB, esto para poder llevar a cabo un programa de control y erradicación de esta problemática en el país, siguiendo el modelo utilizado en otros países, donde se ha logrado el control de la enfermedad.

El análisis de la región 5' NTR, como se ha reportado anteriormente proporcionó información respecto al genotipo del virus DVB presente en las muestras, sin embargo es necesario llevar a cabo otro análisis para resolver el subgenotipo. Por otro lado, el hecho de dar a conocer la existencia de los dos genotipos en las zonas muestreadas además de poder encontrar la presencia de dos genotipos en una muestra proveniente de un solo animal como resultado de una confección mediante el análisis de esta región es información valiosa para establecer un programa de vacunación con vacunas que incluyan los dos genotipos y para el desarrollo de pruebas de diagnóstico tales como, la RT-PCR diseñada y estandarizada en el presente proyecto con el plus de poder identificar el genotipo de las cepas presentes en un proceso infeccioso dentro de un animal.

La región que codifica para la glicoproteína E2 es una de las regiones más variables del genoma del VDVB por esta razón su estudio se llevó a cabo inicialmente mediante su subdivisión en cuatro regiones, obteniendo aun así problemas en la segunda región de esta. Una vez que se logró tener la secuencia completa del gen, y poder hacer el análisis, se observó que la mayor variabilidad se encuentra presente en el genotipo 1 siendo probablemente la razón por la cual se ha dividido en tantos subgenotipos.

Con los datos obtenidos y la información recabada en este trabajo podemos concluir que el comportamiento del virus en las diferentes zonas muestreadas de México es similar a la reportada en otras regiones del continente en cuanto a la distribución de sub-genotipos, lo cual de alguna forma era de esperarse, siendo la principal razón la movilización de animales desde Estados Unidos y Canadá a México así como de México a diferentes países de Sudamérica y viceversa.

Cabe mencionar que con las herramientas utilizadas en este estudio no podemos determinar si dentro de las muestras positivas a un solo genotipo co-existen ambos biotipo (CP y NCP), esto sería de gran importancia para el diagnóstico y prevención de la enfermedad de las mucosas la cual es desencadenada por la presencia de ambos biotipos en un animal infectado, esto puede ser por una introducción de una nueva cepa al hato o por la mutación de una cepa establecida en el mismo (Peterhans et al., 2010, Hilbe et al., 2013). Es importante resaltar que en México no se cuenta con estudios que describa el estatus del VDVB, por lo que cobra mayor importancia definir que cepas existen en el país.

Por último se puede decir que se cumplió con el objetivo principal del proyecto al poder determinar las cepas predominantes en diferentes regiones del país con la limitante de que no se analizó todo el país pero es un buen ensayo de la situación del VDVB en México.

REFERENCIAS

- AGAPOV, E. V., MURRAY, C. L., FROLOV, I., QU, L., MYERS, T. M. & RICE, C. M. 2004. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus. *J Virol*, 78, 2414-25.
- BECHER, P., ORLICH, M., KOSMIDOU, A., KONIG, M., BAROTH, M. & THIEL, H. J. 1999. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, 262, 64-71.
- BECHER, P. & TAUTZ, N. 2011. RNA recombination in pestiviruses: cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA Biol*, 8, 216-24.
- BOSON, B., GRANIO, O., BARTENSCHLAGER, R. & COSSET, F. L. 2011. A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathog*, 7, e1002144.
- BOTTON, S. A., DA-SILVA, A. M., BRUM, M. C., WEIBLEN, R. & FLORES, E. F. 1998. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Braz J Med Biol Res*, 31, 1429-38.
- BRODERSEN, B. W. 2014. Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Vet Pathol*, 51, 453-64.

- BRUSCHKE, C. J., HULST, M. M., MOORMANN, R. J., VAN RIJN, P. A. & VAN OIRSCHOT, J. T. 1997. Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol*, 71, 6692-6.
- BUCKWOLD, V. E., BEER, B. E. & DONIS, R. O. 2003. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Antiviral Res*, 60, 1-15.
- CANTU, A., ORTEGA, S. J., MOSQUEDA, J., GARCIA-VAZQUEZ, Z., HENKE, S. E. & GEORGE, J. E. 2008. Prevalence of infectious agents in free-ranging white-tailed deer in northeastern Mexico. *J Wildl Dis*, 44, 1002-7.
- COLLINS, M. E., DESPORT, M. & BROWNLIE, J. 1999. Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. *Virology*, 259, 85-98.
- CHOI, K. H., GROARKE, J. M., YOUNG, D. C., KUHN, R. J., SMITH, J. L., PEVEAR, D. C. & ROSSMANN, M. G. 2004. The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhea virus establishes the role of GTP in de novo initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4425-30.
- EL OMARI, K., IOURIN, O., HARLOS, K., GRIMES, J. M. & STUART, D. I. 2013. Structure of a pestivirus envelope glycoprotein E2 clarifies its role in cell entry. *Cell Rep*, 3, 30-5.
- FULTON, R. W., RIDPATH, J. F., ORE, S., CONFER, A. W., SALIKI, J. T., BURGE, L. J. & PAYTON, M. E. 2005. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)

subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet Microbiol*, 111, 35-40.

GAMLEN, T., RICHARDS, K. H., MANKOURI, J., HUDSON, L., MCCAULEY, J., HARRIS, M. & MACDONALD, A. 2010. Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. *J Gen Virol*, 91, 133-44.

GIAMMARIOLI, M., CEGLIE, L., ROSSI, E., BAZZUCCHI, M., CASCIARI, C., PETRINI, S. & DE MIA, G. M. 2015. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. *Virus Genes*, 50, 147-51.

GIANGASPERO, M., APICELLA, C. & HARASAWA, R. 2013. Numerical taxonomy of the genus Pestivirus: new software for genotyping based on the palindromic nucleotide substitutions method. *J Virol Methods*, 192, 59-67.

GRUMMER, B., GROTHA, S. & GREISER-WILKE, I. 2004. Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 51, 427-32.

HILBE, M., GIRAO, V., BACHOFEN, C., SCHWEIZER, M., ZLINSZKY, K. & EHRENSPERGER, F. 2013. Apoptosis in Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)-induced mucosal disease lesions: a histological, immunohistological, and virological investigation. *Vet Pathol*, 50, 46-55.

- HORWOOD, P. F. & MAHONY, T. J. 2011. Multiplex real-time RT-PCR detection of three viruses associated with the bovine respiratory disease complex. *J Virol Methods*, 171, 360-3.
- KALAYCIOGLU, A. T. 2007. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination. A review. *Vet Q*, 29, 60-7.
- KALAYCIOGLU, A. T., RUSSELL, P. H. & HOWARD, C. R. 2012. The characterization of the neutralizing bovine viral diarrhea virus monoclonal antibodies and antigenic diversity of E2 glycoprotein. *J Vet Med Sci*, 74, 1117-20.
- KREY, T., THIEL, H. J. & RUMENAPF, T. 2005. Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *J Virol*, 79, 4191-200.
- LANYON, S. R., HILL, F. I., REICHEL, M. P. & BROWNLIE, J. 2014. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Vet J*, 199, 201-9.
- LAZAR, C., ZITZMANN, N., DWEK, R. A. & BRANZA-NICHITA, N. 2003. The pestivirus E(rns) glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology*, 314, 696-705.
- LOY, J. D., GANDER, J., MOGLER, M., VANDER VEEN, R., RIDPATH, J., HARRIS, D. H. & KAMRUD, K. 2013. Development and evaluation of a replicon particle vaccine expressing the E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in cattle. *Viol J*, 10, 35.

- LUZZAGO, C., LAUZI, S., EBRANATI, E., GIAMMARIOLI, M., MORENO, A., CANNELLA, V., MASOERO, L., CANELLI, E., GUERCIO, A., CARUSO, C., CICCOCCHI, M., DE MIA, G. M., ACUTIS, P. L., ZEHENDER, G. & PELETTO, S. 2014. Extended genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. *Biomed Res Int*, 2014, 147145.
- MATHAPATI, B. S., MISHRA, N., RAJUKUMAR, K., NEMA, R. K., BEHERA, S. P. & DUBEY, S. C. 2010. Entry of bovine viral diarrhoea virus into ovine cells occurs through clathrin-dependent endocytosis and low pH-dependent fusion. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 46, 403-7.
- MEERTENS, L., BERTAUX, C. & DRAGIC, T. 2006. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol*, 80, 11571-8.
- MINAMI, F., NAGAI, M., ITO, M., MATSUDA, T., TAKAI, H., JINKAWA, Y., SHIMANO, T., HAYASHI, M., SEKI, Y., SAKODA, Y., SUGIURA, K. & AKASHI, H. 2011. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhoea virus subgenotypes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 34, 35-9.
- MISHRA, N., RAJUKUMAR, K., PITALE, S. S., PRAKASH, A., NEMA, R. K., BEHERA, S. P. & DUBEY, S. C. 2010. Evidence of a humoral immune response against the prokaryotic expressed N-terminal autoprotease (N(pro)) protein of bovine viral diarrhoea virus. *J Biosci*, 35, 79-86.

- MOHAMED, Y. M., BANGPHOOMI, N., YAMANE, D., SUDA, Y., KATO, K., HORIMOTO, T. & AKASHI, H. 2014. Physical interaction between bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 4A and adenosine deaminase acting on RNA (ADAR). *Arch Virol*, 159, 1735-41.
- NEILL, J. D. 2013. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*, 41, 2-7.
- O'NEILL, R., MOONEY, J., CONNAGHAN, E., FURPHY, C. & GRAHAM, D. A. 2014. Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: a retrospective study. *Vet Rec*, 175, 351.
- OGUZOGLU, T. C., MUZ, D., YILMAZ, V., ALKAN, F., AKCA, Y. & BURGU, I. 2010. Molecular characterization of Bovine virus diarrhea viruses species 2 (BVDV-2) from cattle in Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 42, 1175-80.
- PECORA, A., MALACARI, D. A., PEREZ AGUIRREBURUALDE, M. S., BELLIDO, D., ESCRIBANO, J. M., DUS SANTOS, M. J. & WIGDOROVITZ, A. 2015. Development of an enhanced bovine viral diarrhea virus subunit vaccine based on E2 glycoprotein fused to a single chain antibody which targets to antigen-presenting cells. *Rev Argent Microbiol*, 47, 4-8.
- PECORA, A., MALACARI, D. A., RIDPATH, J. F., PEREZ AGUIRREBURUALDE, M. S., COMBESSIES, G., ODEON, A. C., ROMERA, S. A., GOLEMBA, M. D. & WIGDOROVITZ, A. 2014. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res Vet Sci*, 96, 204-12.

- PETERHANS, E., BACHOFEN, C., STALDER, H. & SCHWEIZER, M. 2010. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet Res*, 41, 44.
- POOLE, T. L., WANG, C., POPP, R. A., POTGIETER, L. N., SIDDIQUI, A. & COLLETT, M. S. 1995. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology*, 206, 750-4.
- PRECIADO, M. V., VALVA, P., ESCOBAR-GUTIERREZ, A., RAHAL, P., RUIZ-TOVAR, K., YAMASAKI, L., VAZQUEZ-CHACON, C., MARTINEZ-GUARNEROS, A., CARPIO-PEDROZA, J. C., FONSECA-CORONADO, S. & CRUZ-RIVERA, M. 2014. Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol*, 20, 15992-6013.
- PRESI, P., STRUCHEN, R., KNIGHT-JONES, T., SCHOLL, S. & HEIM, D. 2011. Bovine viral diarrhoea (BVD) eradication in Switzerland--experiences of the first two years. *Prev Vet Med*, 99, 112-21.
- RIDPATH, J. F. 2010. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26, 105-21, table of contents.
- RIDPATH, J. F. & BOLIN, S. R. 1991. Hybridization analysis of genomic variability among isolates of bovine viral diarrhoea virus using cDNA probes. *Mol Cell Probes*, 5, 291-8.
- RONECKER, S., ZIMMER, G., HERRLER, G., GREISER-WILKE, I. & GRUMMER, B. 2008. Formation of bovine viral diarrhoea virus E1-E2

heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *J Gen Virol*, 89, 2114-21.

ROSHKARI, F., MOHAMMADI, G. & MAYAMEEI, A. 2012. Serological evaluation of relationship between viral pathogens (BHV-1, BVDV, BRSV, PI-3V, and Adeno3) and dairy calf pneumonia by indirect ELISA. *Trop Anim Health Prod*, 44, 1105-10.

ROSSI, L. M., ESCOBAR-GUTIERREZ, A. & RAHAL, P. 2015. Advanced molecular surveillance of hepatitis C virus. *Viruses*, 7, 1153-88.

ROZAS, J. 2009. DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. *Methods Mol Biol*, 537, 337-50.

SEGURA-CORREA, J. C., SOLORIO-RIVERA, J. L. & SANCHEZ-GIL, L. G. 2010. Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herds of Michoacan, Mexico. *Trop Anim Health Prod*, 42, 233-8.

SOLIS-CALDERON, J. J., SEGURA-CORREA, V. M. & SEGURA-CORREA, J. C. 2005. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk factors. *Prev Vet Med*, 72, 253-62.

STOKSTAD, M., BROWNLIE, J. & COLLINS, M. E. 2004. Analysis of variation of bovine viral diarrhoea virus E2 sequence following transplacental infection of cattle. *Vet Microbiol*, 102, 141-5.

- TAJIMA, M. 2004. Bovine viral diarrhoea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. *Vet Microbiol*, 99, 131-8.
- TSCHERNE, D. M., EVANS, M. J., MACDONALD, M. R. & RICE, C. M. 2008. Transdominant inhibition of bovine viral diarrhoea virus entry. *J Virol*, 82, 2427-36.
- VILCEK, S., GREISER-WILKE, I., DURKOVIC, B., OBRITZHAUSER, W., DEUTZ, A. & KOFER, J. 2003. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria). *Vet Microbiol*, 91, 285-91.
- VILCEK, S., PATON, D. J., DURKOVIC, B., STROJNY, L., IBATA, G., MOUSSA, A., LOITSCH, A., ROSSMANITH, W., VEGA, S., SCICLUNA, M. T. & PAIFI, V. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol*, 146, 99-115.
- WEBER, M. N., SILVEIRA, S., MACHADO, G., GROFF, F. H., MOSENA, A. C., BUDASZEWSKI, R. F., DUPONT, P. M., CORBELLINI, L. G. & CANAL, C. W. 2014. High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Res*, 191, 117-24.
- WEISKIRCHER, E., ALIGO, J., NING, G. & KONAN, K. V. 2009. Bovine viral diarrhoea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Viol J*, 6, 185.

XU, J., MENDEZ, E., CARON, P. R., LIN, C., MURCKO, M. A., COLLETT, M. S.
& RICE, C. M. 1997. Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase:
polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of
an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol*, 71, 5312-22.

Índice de figuras

Figura 1. Representación grafica del VDVB	5
Figura 2. Organización del genoma de VDVB	6
Figura 3. Representación esquemática de la estructura del cristal de gpE2, mostrando los cuatro dominios DA, DB, DC y DD. A)	9
Figura 4. Replicación de VDVB	12
Figura 5. Diseño del ensayo para el análisis de la gp E2	28
Figura 6. Amplificación multiplex	30
Figura 7. Número de co-infecciones por estado de la Republica y las combinaciones encontradas en el presente estudio	32
Figura 8. Células MDBK infectadas	33
Figura 9. Gel con productos de RT-PCR para genotipificación.	34
Figura 10. Ubicación Geográfica de Aislamientos del VDVB G1 y G2	35
Figura 11. Análisis de variabilidad nucleotídica	36
Figura 12. Purificación de productos para secuenciación 5' NTR	37
Figura 13. Análisis filogenético utilizando 5' NTR	38
Figura 14. Análisis de la calidad de los productos de RT-PCR de la gp. E2 purificados para secuenciar	40
Figura 15. Ensamblado y edición de secuencias para la obtención de la secuencia completa del gen que codifica para la gp E2	41
Figura 16. Análisis filogenético de la gp E2	42

Índice de cuadros

Cuadro 1. Distribución de muestreo	22
Cuadro 2. Región analizada en cada genoma viral y tamaño de producto en el PCR Multiplex	24
Cuadro 3. Distribución de muestras positivas por estado y agente infeccioso.	31
Cuadro 4 Distribución de muestras positivas al VDVB por estado	33
Cuadro 5 Tamaño de amplicones, N1, N2, N3 y N4 de la gp E2	39

Anexo 1 Materiales y Reactivos.

Material/Reactivo	Catálogo	Presentación
RNeasy Mini Kit (Qiagen)	74106	250 U
One step RT-PCR Kit (Qiagen)	210212	100 Rxn
Bromuro de Etidio (UltraPure™) Ethidium Bromide	15585011	10 mg/ml
InsTAclone PCR cloning Kit (ThermoFisher)	K1213	20 Rxn
Medio DMEM (GIBCO)	12800-07	10 L
Trizol (Invitrogen)	15596-026	100 ml
Isopropanol (J.T. Baker) Molecular grade	BAKR9037	4 L
Sondas tipo Taqman (Discriminación)	Biosearch	CUSTOM SEQUENCE DETECTION PRIMER 10NM
E-Gel® SizeSelect™ 2% (Invitrogen) (Proprietary fluorescent stain)	G661002	10 U
E-Gel® EX 4% (Invitrogen) (Proprietary fluorescent stain)	G501804	10 U
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	SM0241	50 ug
Tubos vacutainer con heparina (Becton Dickinson)	367884	500 U
Cámara de electroforesis (Owl, Thermo scientific)	Owl easy cast B1	/

Fuente de poder (Thermo electron)	EC105	/
Penicilina/streptomocina- 100 mg/ml (GIBCO)	15140-122	10,000 U
SE, Horse fetal serum (GIBCO)	16050122	500 ml
Gabinete de bioseguridad nivel II (Nuair)	UN-425400	/
Botella de 25 cm ² (Sarsted)	83.1810	100 U
Tubo de polipropileno de 1.5 ml (Axygen)	MCT-150-C	1000 U
Centrifuga refrigerada para microtubos (Sorvall)	Legend RT II	/
BigDye terminator (Applied BioSystems)	4337455	/
Placas de filtrado (Millipore)	S384PCR10	10
Analizador genético (Applied BioSystems)	3130/3130xl	/
Aguja Precision Glide NeedleS 16X ½ in (Becton Dickinson)	BD 360212	100 U
Termociclador Mastercycler pro (EPPENDORF).	6325 000.013	/
Muesqueador de orejas Vetpro®	/	/
Centrifuga refrigerada (BECKMAN CULTER)	Allegra X-30R	/
Agarosa (Invitrogen) Ultrapure agarose	16500-500	500 g
Bioanalizador (Agilent)	2100	/

E-Gel® Agarose System (Invitrogen)	G6465)	/
Células MDBK (ATCC)	ATCC CCL-22	1 ml
Placas de 6 pozos (EPPENDORF)	0030720113	60
Tubo conico (Sarsted)	62.553.001	50
Electroporador (Branson)	5510	/