



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**DETERMINACIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL
BOVINA PREDOMINANTES EN POBLACIONES GANADERAS DE SEIS
REGIONES DE MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
NINNET EVELYN GÓMEZ ROMERO**

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

PhD. JULIA RIDPATH
NATIONAL ANIMAL DISEASE CENTER, USDA

DR. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**ACADÉMICO INVITADO:
DR. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA**
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM



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, Graciela Romero Vertiz y Francisco Gómez Franco, por todo su amor y cariño incondicional, ustedes son fuente de mi motivación e inspiración diaria. Gracias por guiarme con sus sabios consejos a lo largo de mi vida. No podría consolidar ninguna meta si no fuera por su apoyo, valoro todo su esfuerzo y admiro todo lo que han hecho por mí. Mejor ejemplo de vida no podía tener.

A mis hermanas, Shanty y Mimi, pocos tienen la dicha de tener la relación que tenemos. Gracias por siempre estar a mi lado, por preocuparse por mí y ayudarme a ser mejor persona y por agregarle mucha alegría a mi vida. Por compartir su vida conmigo y apoyarme en cada proyecto de vida.

A mi Carmina, por ser ejemplo de fortaleza y superación pese a las adversidades.

A Renata e Íñigo, los amo con todo lo que soy.

A mis amigas Mariana e Isa. Mariana gracias por escucharme, por tu sinceridad y por siempre estar y crecer conmigo. Isa gracias por tus consejos, por el apoyo y ser mi cómplice.

A Rodolfo, por irrumpir con tu presencia en mi vida de la mejor manera, iluminándola con tu amor, paciencia, ánimo y motivación. Por tu ayuda y apoyo durante este proceso, juntos somos un gran equipo. Y principalmente por sumarle felicidad a mis días.

A mis amigos de Laboratorio Isa y Lázaro por su ayuda y por compartir muchos momentos importantes durante esta etapa; a Yaya, Quique, Adolfo, Jos, Víctor y Silvia por hacer del lab un área de trabajo muy agradable.

AGRADECIMIENTOS

A la FMVZ-UNAM por la formación académica y darme una identidad como profesionalista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sustentar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara por su apoyo constante y estar siempre atento al desarrollo de este trabajo. Gracias por confiar en mí, por todos los consejos para ser mejor cada día y fomentar en mí el fijarme nuevas metas.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por su asesoría durante este proceso, por sus consejos que enriquecieron el trabajo de investigación y por prepararme profesionalmente.

Al Dr. Daniel Martínez Gómez (UAM) por cada uno de los comentarios, por tu disposición y por compartir tus conocimientos.

Al PhD Eduardo Casas (National Animal Disease Center) por su ayuda, apoyo y orientación tanto profesional como personal durante mi estancia en el NADC.

A la PhD Julia Ridpath (National Animal Disease Center/BVDV Laboratory) por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio, lo cual representó un gran reto personal. Por su asesoría y enseñanza, por la disposición y el tiempo invertido en este proyecto. La experiencia de poder trabajar con todos los integrantes de laboratorio contribuyó a mi formación profesional y enriqueció mi visión del mundo.

Al Kathy Dunbar McMullen por tú contribución en el procesamiento de las muestras. Por siempre estar dispuesta a ayudarme y enseñarme los que sabes. Por tu paciencia, por cada una de las pláticas de aliento y sobre todo por tu valiosa amistad.

Al personal del Laboratorio de BVDV: Renae Lesan, Patricia Federico, Fernando Bauermann por cada una de sus aportaciones y ayuda durante mi estancia.

A los miembros jurado evaluador de la tesis: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara, Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, Dra. Selene Zarate Guerra y Dr. José Iván Sánchez Betancourt. Gracias por sus acertadas correcciones, comentarios y sugerencias que contribuyeron al mejoramiento del presente trabajo.

Al M. en C. Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla, Ing. Gerardo Quintanilla Martínez, Lic. Laura Quintanilla Martínez, M. en C. Martín Ortiz Estrada, MVZ

Adalberto Castillo Torres, MVZ. José Carranza Castañeda, Lic. Macrino Pérez Morgado por su ayuda y aportaciones para la realización del presente trabajo.

Al General Ricardo Trevilla Trejo, Mayor Luis Javier Atenas Sánchez, Mayor Fredy Fernando Ortiz Aparicio, Sargento Pascual Ramírez, Teniente Edgardo Coronado López, Sargento Cirilo Reyes Badillo, M. en C. Martha Juárez Cortés por las contribuciones para la elaboración de este trabajo.

Al Técnico Raúl Hernández Aragón por tu apoyo en la preparación de materiales, medios y reactivos.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina (vDVB) es el agente causante de la diarrea viral bovina (DVB), una enfermedad de distribución mundial y endémica de las poblaciones ganaderas. Este virus está asociado a la presentación de diversas manifestaciones clínicas en ganado que incluyen enfermedades respiratorias, desordenes gastrointestinales, síndrome hemorrágico y problemas reproductivos como abortos, reabsorción, infertilidad, momificaciones, nacimiento de animales inmunotolerantes o débiles. Debido a esto la DVB genera importantes pérdidas económicas a la industria ganadera.

En México, la información disponible sobre los genotipos del vDVB que circulan en poblaciones ganaderas es escasa, por lo que aún no han sido identificados los genotipos que circulan en el ganado. Debido a esto, se realizó la técnica de Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) con el propósito de detectar un fragmento de la región 5'UTR vDVB a partir muestras de suero bovino y capa flogística, de bovinos provenientes de seis regiones de México; posteriormente las muestras positivas se secuenciaron para determinar los tipos del vDVB. Los resultados demostraron la presencia de los linajes virales vDVB-1a en el 11.76%, vDVB-1b en el 4.41%, vDVB-1c en el 75%, y vDVB-2a en un 2.94% de las muestras positivas totales. Asimismo, un hallazgo importante que se detectó fue la presencia del genoma del virus de la Enfermedad de la frontera y del *Pestivirus* atípico denominado Pronghorn.

Adicionalmente se realizaron ensayos de neutralización viral con el objetivo de determinar el título de anticuerpos en los sueros de bovino, encontrando variaciones en los títulos de anticuerpos en cada población ganadera, reflejo de los diferentes estados zoonitarios de cada unidad de producción muestreada.

ABSTRACT

Bovine viral diarrhea (BVD) is the disease in cattle as a result of the infection with the bovine viral diarrhea virus (BVDV), which is distributed in cattle populations throughout the world. The BVD is associated with a wide range of clinical manifestations, including severe respiratory disease, gastroenteric disorders, hemorrhagic syndrome; however the most significant economic losses are associated to reproductive disorders such as abortion, mummifications, stillbirths, return to estrus, failure in fertilization and the birth of weak animals or immunotolerant. The economic losses due to a BVDV infection have been estimated up to 46 million dollars per calving.

In Mexico, the information regarding the BVDV genotypes circulating in the cattle industry is unknown; it is known that the BVDV is present in our country, although the viral genotypes remains unknown. In order to detect a portion of the BVDV genome in bovine serum samples and buffy coat from cattle of six regions of Mexico, we performed a Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Positive samples were then sequenced to infer the BVDV genotypes. We were able to detect BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1c and BVDV-2a in the 11.76%, 4.41%, 75%, 2.94% from the total positive samples, respectively. Likewise, an important finding was the presence of the viral genome of Border disease virus and the atypical Pronghorn Pestivirus.

Additionally, viral neutralization assays were carried out in order to determine the antibodies titer in the cattle sera, finding variations in antibody titers in each livestock population, as a reflect of the different status of each production unit .

Tema	CONTENIDO	Página
Resumen		IV
Abstract		V
1. Introducción		1
1.1 Historia		1
1.2 Características del virus de la diarrea viral bovina		7
1.2.1 Clasificación taxonómica		7
1.2.2 Morfología		7
1.2.3 Genoma		8
1.2.4 Proteínas virales		9
1.2.4.1 Proteínas estructurales		9
1.2.4.2 Proteínas no estructurales		10
1.2.5 Genotipos		13
1.2.6 Biotipos		15
1.2.7 Replicación viral		17
1.3 Patogenia y Patogénesis		19
1.3.1 Hospedador		19
1.3.2 Transmisión		19
1.3.3 Patogenia		21
1.4 Inmunidad contra el virus de la diarrea viral bovina		25
1.5 Inmunosupresión		26
1.6 Epidemiología		27
1.6.1 Situación actual		27
1.6.2 Seroprevalencia		29
1.6.3 Situación en México		29
1.6.4 Impacto económico		30
1.6.5 Diagnóstico		32
1.6.6 Control y erradicación		34
1.6.7 Vacunas		36
2. Justificación		41
3. Hipótesis		42
4. Objetivos		43
4.1 Objetivo general		43
4.2 Objetivos específicos		43
5. Material y Métodos		44
5.1 Cepas de referencia		44
5.1.1 Titulación de cepas de referencia		44
5.2 Neutralización viral		45
5.3 Muestras de trabajo (suero)		46
5.4 Muestras de trabajo (capa flogística)		47
5.4.1 Toma de muestra		47
5.4.2 Extracción de ARN total		48
5.3.3 Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa		48

5.4 Secuenciación	50
5.5 Construcción y análisis filogenético	51
6. Resultados	52
6.1 Títulos de cepas virales	52
6.2 Neutralización viral	52
6.3 Amplificación del fragmento de la región 5'UTR en muestras de suero	64
6.4 Amplificación del fragmento de la región 5'UTR en muestras de capa flogística	65
6.5 Secuenciación	65
6.6 Análisis filogenético de muestras de suero	67
6.7 Análisis filogenético de muestras de capa flogística	72
7. Discusión	73
8. Conclusiones	81
9. Prospectiva	82
10. Referencias	83
11. Anexos	98
Anexo 1. Muestras de trabajo (suero)	98
Anexo 2. Muestras de trabajo (capa flogística)	109
Anexo 3. Resultados de la RT-PCR a partir de muestras de suero por región	115
Anexo 4. Resultados de la RT-PCR a partir de muestras de capa flogística por región	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1.1	Estructura del vDVB.	7
1.2	Organización del genoma del vDVB.	8
1.3	Ciclo de replicación del vDVB.	18
6.1	Análisis filogenético del vDVB basados en la región 5'UTR.	69
6.2	Análisis filogenético de <i>Pestivirus</i> basados en la región 5'UTR.	70
6.3	Análisis filogenético de <i>Pestivirus</i> basados en la región 5'UTR.	71
6.4	Análisis filogenético de <i>Pestivirus</i> basados en la región 5'UTR.	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1.1	Subgenotipos del vDVB-1 predominantes en diversos países.	28
1.2	Vacunas comerciales disponibles en México.	37
5.1	Número de muestras de suero procesadas por región.	46
5.2	Número de muestras de capa flogística procesadas por región.	47
5.3	Iniciadores utilizados para amplificar un fragmento de la región 5'UTR.	48
5.4	Reactivos y concentraciones utilizados para la RT-PCR (VIL 324/326, HCV 90/368 y 5UTR/START).	49
5.5	Reactivos y concentraciones utilizados para la RT-PCR (iniciadores HoBi).	49
5.6	Condiciones de las RT-PCR. Condiciones de temperatura y ciclos en la RT-PCR establecidas en el termociclador.	50
6.1	Títulos de las cepas virales utilizadas como testigos positivos.	52
6.2	Resultados de la neutralización viral de la región de Napateco, Hidalgo.	52
6.3	Resultados de la neutralización viral de la región de Acayucan, Veracruz. Animales mayores de un año.	54
6.4	Resultados de la neutralización viral de la región de Acayucan, Veracruz. Animales menores de un año.	55
6.5	Resultados de la neutralización viral de la región Victoria Tamaulipas. Animales mayores de un año.	55
6.6	Resultados de la neutralización viral de la región de Victoria, Tamaulipas. Animales menores de un año.	56
6.7	Resultados de la neutralización viral de la región de Puente Ixtla, Morelos. Animales mayores de una año.	57
6.8	Resultados de la neutralización viral de la región de San Juan	59

	del Río, Querétaro. Animales mayores de un año.	
6.9	Resultados de la neutralización viral de la región de San Juan del Río, Querétaro. Animales menores de un año.	60
6.10	Resultados de la neutralización viral de la región de Santa Gertrudis, Saucillo Chihuahua. Animales menores de un año.	61
6.11	Resultados de la neutralización viral de la región de Santa Gertrudis, Saucillo Chihuahua. Animales mayores de un año.	64
6.12	Número de muestras positivas al vDVB por RT-PCR a partir de muestras de suero.	64
6.13	Número de muestras positivas al vDVB por RT-PCR a partir de muestras de capa flogística.	65
6.14	Relación de muestras de suero positivas y su identificación para secuenciación.	65
6.15	Relación de muestras capa flogística positivas y su identificación para secuenciación.	67

ABREVIATURAS UTILIZADAS

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
cm ²	Centímetros cuadrados
CP	Citopático
DVB	Diarrea viral bovina
DVB-EM	Diarrea viral bovina-Enfermedad de las mucosas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EM	Enfermedad de las mucosas
h	Hora (s)
HVB-1	Herpevirus bovino tipo 1
IC	Infección congénita
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
kb	kilobases
kDa	Kilodaltones
LDLr	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>
Log	Logaritmo
MDBK	<i>Madin-Darby Bovine Kidney</i>
µl	Microlitros
µM	Micromolar
mM	Milimolar
min	Minutos
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
ml	Mililitros
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
NADL	<i>National Animal Disease Laboratory</i>
NCP	No citopático
nm	Nanómetros
ng	Nanogramos
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> ; marco de lectura
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI	Persistentemente infectado
PNS	<i>Palindromic nucleotide substitutions</i>
PI3	Virus paraifluenza 3
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>Reverse transcription- Polymerase Chain Reaction</i>
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
seg	segundos
SFB	Suero fetal bovino
U	Unidades
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> ; región no traducida
vCoB	Coronavirus bovino
vDVB	Virus de la diarrea viral bovina
vDVB-1	Virus de la diarrea viral bovina tipo 1
vDVB-2	Virus de la diarrea viral bovina tipo 2
vEF	Virus de la enfermedad de las fronteras
vFPC	Virus de la fiebre porcina clásica
vGET	virus de la gastroenteritis transmisible de cerdos
vSRB	Virus sincitial respiratorio bovino
TCID	<i>Tissue culture infective doses</i>
%	Porcentaje

1. Introducción

1.1 Historia

La enfermedad de la diarrea viral bovina (DVB) fue descrita por primera vez en 1946 por dos grupos de investigadores. Olafson *et al.*, de la Universidad de Cornell en Ithaca, Nueva York la refirieron como una enfermedad caracterizada por leucopenia, depresión, fiebre, diarrea, deshidratación, anorexia, sialorrea, descarga nasal, hemorragias y erosiones gastrointestinales; la enfermedad fue observada en “una de las vacas del ganado” por el Dr. Francis Fox quien inicialmente consideró dicha enfermedad como disentería clásica de invierno. Se considera que el origen del brote pudo haber sido una vaca de 4 años de edad de la raza Red Devon importada de Inglaterra dos años antes y alojada en una granja cerca de Ithaca (Fox, 1996). Esta enfermedad con signos y lesiones variables, comenzó a llamarse “diarrea viral de los bovinos” (Olafson *et al.*, 1946). Asimismo, Childs la describió en Saskatchewan, Canadá como una enfermedad en el ganado parecida a la DVB pero con una presentación clínica más grave nombrándola “Enfermedad X” (Childs, 1946); tiempo después este reporte fue considerado como la primera descripción de la enfermedad de las mucosas (EM).

Fue en el año 1953, cuando Ramsey y Chivers, de Estados Unidos reportaron la presencia de una enfermedad que describieron como “esporádica y fatal” caracterizada por fiebre, anorexia, depresión, sialorrea, descarga nasal, hemorragias, erosiones y úlceras gastrointestinales, diarrea grave con heces acuosas en ocasiones mezcladas con sangre. A dicha enfermedad le asignaron el nombre de la enfermedad de las mucosas (EM), basados en las diferencias de las lesiones del tracto gastrointestinal y en lo difícil que resultaba reproducirla experimentalmente, fue considerada en ese entonces, una enfermedad diferente a la DVB (Ramsey *et al.*, 1953).

En 1957, Underdahl *et al.*, aislaron un virus de un caso de EM, que causaba efectos citopáticos, como vacuolización y muerte celular, en cultivo celular. Asimismo, dichos investigadores intentaron reproducir la enfermedad

experimentalmente, sin embargo, no tuvieron éxito (Underdahl *et al.*, 1957). En este mismo año, investigadores de la Universidad de Cornell lograron aislar, a partir de un caso de DVB, un virus que no causaba efecto citopático en cultivo celular (Lee y Gillespie, 1957). Hasta este momento el vínculo entre las dos enfermedades, DVB y EM, era desconocido.

Después del aislamiento de dos virus no citopáticos provenientes de dos casos de DVB, que incluye a la cepa de referencia NY-1 (Lee y Gillespie, 1957), en 1960 Gillespie *et al.*, reportaron el aislamiento de un virus de DVB a partir de un caso que se presentó en Oregon; esta cepa viral fue llamada *Oregon C24V*, misma que fue inoculada en un bovino que posteriormente presentó la signología característica de la enfermedad y produjo anticuerpos que neutralizaron tanto cepas citopáticas como no citopáticas (Gillespie *et al.*, 1960). Más adelante en 1961, Coggins *et al.*, elaboraron la primer vacuna comercial contra la DVB al realizar 32 pasajes de la cepa *Oregon C24V* en cultivos celulares de origen bovino (Coggins *et al.*, 1961). Los bovinos a los que se les administró la vacuna presentaron seroconversión sin signos clínicos de la enfermedad; aunque desafortunadamente, la vacuna causó una serie de efectos adversos como malformaciones congénitas, trastornos de la fertilidad y la EM (Coggins *et al.*, 1961).

El descubrimiento de cepas citopáticas permitió el desarrollo de ensayos de seroneutralización y neutralización en placa. Estas cepas podían ser estudiadas mejor que las no citopáticas, y su neutralización con antisueros permitió la caracterización de la relación antigénica de los virus de los casos de DVB y EM (Gillespie *et al.*, 1961). En los trabajos en donde se utilizó la técnica de neutralización viral, se determinó que los agentes virales aislados de casos de DVB y EM en Norte América y Europa eran los mismos (Kniazeff *et al.*, 1961); y que tanto la DVB como la EM eran diferentes manifestaciones de la enfermedad causadas por el mismo agente viral (Thompson, 1963).

Posteriormente, en 1968, la enfermedad fue oficialmente conocida como diarrea viral bovina-enfermedad de las mucosas (DVB-EM) (Kennedy *et al.*, 1968). La caracterización de las propiedades físicas y antigénicas del virus permitieron determinar la similitud que existía entre el virus de la EM y de la DVB, así mismo, se estableció la relación antigénica que tenía con el entonces llamado virus del cólera porcino, actualmente llamado virus de la fiebre porcina clásica vFPC (Darbyshire *et al.*, 1962). Incluso, debido a la relación entre el virus de la DVB-EM y el vFPC, en Estados Unidos se propuso el uso de vacunas de virus activo de la DVB-EM para la inmunización de cerdos contra el vFPC; idea que fue descartada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) debido a que el virus de DVB-EM fue aislado de cerdos infectados de manera natural y experimental (Fernelius *et al.*, 1973).

Años después, las pruebas serológicas realizadas indicaron que el agente que originaba la enfermedad de las fronteras (EF) en las ovejas también estaba relacionado con el virus de DVB-EM y el vFPC (Plant *et al.*, 1973).

Durante las décadas de los 60's y 70's las investigaciones sobre la DVB se centraron en infecciones experimentales en ganado gestante y en terneros recién nacidos para comprender la patogénesis de la DVB-EM. Diversos trastornos teratogénicos fueron asociados a la infección intrauterina con un virus no citopático de DVB-EM. Dichos experimentos, permitieron entender que los terneros recién nacidos infectados de manera congénita con el vDVB no sobrevivían por más de un par de meses y eventualmente sucumbían a una forma crónica de EM (Malmquist *et al.*, 1968). Se descubrió que estos terneros nacidos de madres infectadas durante estadios tempranos de la gestación, antes del desarrollo inmunológico fetal, eran persistentemente infectados (PI) con el virus y presentaban una anormalidad inmunológica: no producían anticuerpos contra el virus de la DVB-EM (Johnson y Muscoplat, 1973).

En 1978, Coria y McClurkin, describieron una infección persistente por el virus de DVB-EM no citopático, en un toro sano con ausencia de anticuerpos contra el virus, lo cual contribuyó al esclarecimiento eventual de las infecciones por el virus (Coria y McClurkin, 1978a). Posteriormente en 1984, reportaron que los terneros PI no producían anticuerpos contra cepas homólogas del virus de la DVB-EM, aun así eran inmunocompetentes, es decir, tenían la capacidad de producir anticuerpos contra otros agentes infecciosos como el virus de la Rinotraqueitis infecciosa y Parainfluenza 3, y anticuerpos aglutinantes contra *Pasteurella multocida* (McClurkin *et al.*, 1984).

En 1987, Brownlie *et al.*, pudieron discernir la patogenia de la EM al reproducir experimentalmente esta enfermedad en un animal PI, al cual se le inoculó un virus citopático de DVB-EM (Brownlie *et al.*, 1987). Fue entonces cuando se estableció que la EM ocurre solamente en animales PI después de una superinfección con una cepa citopática del vDVB la cual es antigénicamente similar al virus que produjo la infección persistente (Sopp *et al.*, 1994).

A finales de los 80's el vDVB fue clasificado como un *Pestivirus* al igual que el virus de la enfermedad de las fronteras (vEF) y el virus de la fiebre porcina clásica (vFPC), basándose en sus características morfológicas como la envoltura y la cadena ARN positiva, formando parte de la familia *Togaviridae*. Los casos graves de la enfermedad con lesiones causadas por el vDVB fueron designados como EM, en contraste, la enfermedad aguda asociada a cambios clínicos mínimos, de los cuales se aislaba el vDVB no citopático, se designó como DVB (Baker 1987; Radostits y Littlejohns 1988).

La cepa norteamericana NADL y la cepa europea Osloss fueron las primeras en ser secuenciadas (Collett *et al.*, 1988a; Renard *et al.*, 1987) en el año de 1988, ambas clasificadas dentro del genotipo 1 del vDVB.

En esta misma época, en diferentes países se reportaron los primeros casos de síndrome hemorrágico en ganado adulto y terneros, asociado al vDVB no citopático, es decir, en ausencia de una cepa citopática. Esta forma grave de DVB se caracterizó por fiebre y trombocitopenia (Corapi *et al.*, 1990) lo que causaba diarrea sanguinolenta, epistaxis, así como hemorragias petequiales y equimosis en mucosas (Perdrizet *et al.*, 1987; Broes *et al.*, 1992). El virus aislado a partir del brote (aislamiento 890) fue elegido como cepa de referencia (Bolin y Ridpath, 1992) y años más tarde fue secuenciado, en donde se determinó que pertenecía al genotipo 2 del vDVB (Ridpath y Bolin 1995a).

La clonación molecular y la secuenciación completa de los virus permitieron el análisis de su organización y expresión génica, por lo que en 1991 el género *Pestivirus* fue reclasificado en la familia *Flaviviridae* (Andrew *et al.*, 2012; Collett *et al.*, 1988a).

Durante el estudio de diversos brotes de la enfermedad (Carman *et al.*, 1998; Pellerin *et al.*, 1994; David *et al.*, 1994) el genotipo 2 de la DVB fue identificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ridpath *et al.*, 1994). Se sugirió que existía mayor variación en la virulencia del virus no citopático y que era necesario el uso de técnicas mucho más sofisticadas para la caracterización de los virus para comprender la amplia variación en la virulencia entre cepas. Hasta este momento existía el grupo designado vDVB-2 y el vDVB-1 el cual fue subdividido en 1a constituido por las cepas NADL, Oregon y Singer, y 1b con las cepas NY-1 y Osloss (Pellerin *et al.*, 1994).

Después de la segregación del vDVB en 2 genotipos, la caracterización genética de aislamientos obtenidos a partir de ovinos, demostró que estos animales podían estar infectados por ambos genotipos del vDVB y el vEF. El primer aislamiento del vEF secuenciado fue en realidad una cepa del vDVB-2 (Pellerin *et al.*, 1994). Por medio de aislamientos virales obtenidos a partir de jirafas, se demostró que la fauna silvestre también podría estar infectada con

Pestivirus, y el análisis genético del virus dio como resultado un genotipo único. Asimismo, a partir de venados se han aislado *Pestivirus* que pertenecen al vDVB-1 (Van Rijn *et al.*, 1997; Becher *et al.*, 1997).

En el 2001 se examinaron aislamientos provenientes de diferentes países, reportando que el vDVB puede segregarse en por lo menos 11 grupos filogenéticos, conocidos como subgenotipos (Vilcek *et al.*, 2001).

Además de las 4 especies de *Pestivirus* reconocidos por el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), vDVB-1, vDVB-2, vEF y vFPC y la especie tentativa, *Pestivirus* de la jirafa, se han propuesto otras especies. De manera subsecuente, se han detectado la presencia de *Pestivirus* bovinos atípicos en muestras obtenidas de diferentes partes del mundo. Estos *Pestivirus* incluyen el virus D32/00_”HoBi” aislado a partir de un lote de suero fetal bovino (SFB) originario de Brasil (Schirrmeyer *et al.*, 2004), el virus CHKaHo/cont detectado como un contaminante de cultivo celular en Suiza (Stalder *et al.*, 2005), SVA/cont08 detectado en un lote de SFB proveniente de Suramérica (Liu *et al.*, 2009b), IZSPLV_To identificado en lotes de SFB y ganado bovino originario de Italia (Peletto *et al.*, 2010), dos cepas aisladas a partir de fetos abortados en Brasil (Cortez *et al.*, 2006), Brz buf 9 detectado en un búfalo en Brasil (Stalder *et al.*, 2005), Th/04_KhonKaen recuperado del suero de un ternero infectado de manera natural (Liu *et al.*, 2009c), y la cepa Italy-1/10-1 asociado a un brote de enfermedad respiratoria grave en Italia (Decaro 2011); el análisis filogenético de dichos *Pestivirus* sugiere una relación con los vDVB-1 y vDVB-2, por lo que algunos investigadores han propuesto que este grupo de virus representan al vDVB-3 (Liu *et al.*, 2009a).

Hasta la fecha, muchos países han llevado a cabo la clasificación de los vDVB detectados en sus poblaciones ganaderas a partir de diferentes tipos de muestras basándose en secuencias conservadas y no conservadas del genoma

viral, segregando al virus en diversos subgenotipos (Kadir *et al.*, 2008; Booth *et al.*, 2013; Jenckel *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2015).

1.2 Características del virus de la diarrea viral bovina

1.2.1 Clasificación taxonómica

El virus de la diarrea viral bovina (vDVB) es un virus ARN, miembro de la familia *Flaviviridae* y pertenece al género *Pestivirus*. Dentro de esta familia se encuentran los géneros: *Flavivirus* y *Hepacivirus*. El vDVB-1 y vDVB-2 junto con el vEF y el vFPC forman parte del género *Pestivirus* (Andrew *et al.*, 2012).

1.2.2 Morfología

El vDVB es pleomórfico, con un diámetro de 40-60 nm aproximadamente y está envuelto por una capa lipídica que contiene tres grupos de glicoproteínas que recubren la cápside viral (Andrew *et al.*, 2012; Nettleton 1995). Ésta última tiene simetría icosaédrica, con un diámetro de 25 a 37 nm aproximadamente, de naturaleza proteica constituida por la proteína C (Murphy 1999; Vadillo *et al.*, 2002).

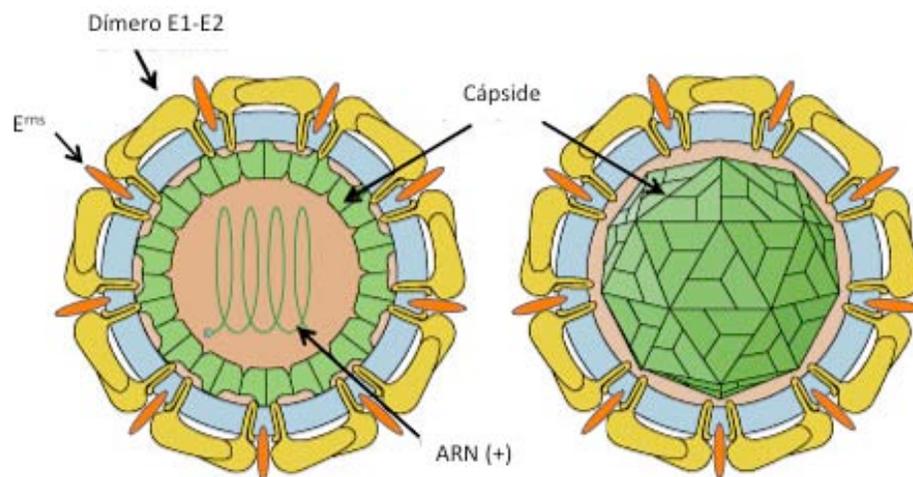


Figura 1.1 Estructura del vDVB. El vDVB tiene un diámetro de 40-60nm con tres glicoproteínas de superficie: E^{ms}, E1 y E2; adicionalmente, la proteína de cápside. Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/39.html

1.2.3 Genoma

El genoma del virus es del tipo ARN de cadena simple con polaridad positiva, no segmentado, y con una longitud de 12.3 kb aproximadamente (Andrew *et al.*, 2012).

La organización del genoma consiste en un marco de lectura (ORF por sus siglas en inglés) de aproximadamente 4000 codones, flanqueado por regiones no traducidas o UTR (*untranslated regions*), 5' (5'UTR) de 381-386 bases y 3' (3'UTR) de 223 bases (Meyers y Thiel 1996; Collett *et al.*, 1988b). La región 5' terminal carece de una estructura cap metilguanosa, pero tiene una estructura secundaria que sustituye la función del cap para el inicio de la traducción; ésta estructura es conocida como sitio interno de entrada al ribosoma (IRES por sus siglas en inglés) (Andrew *et al.*, 2012) tipo III con una longitud de 370-385 nucleótidos (Chon *et al.*, 1998; Pestova *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000). El extremo 3' no está poliadenilado, por el contrario tiene una cadena corta poli C (Mahy y Regenmortel, 2010).

El ORF es traducido en una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos, la cual se escinde co- y post-traduccionalmente por proteasas celulares y virales en las proteínas virales individuales: N^{pro}-C-E^{ns}-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B (Rümenapf *et al.*, 1993). Dichas proteínas están clasificadas en proteínas estructurales, que incluyen la proteína C y las tres glicoproteínas de envoltura E^{ns}, E1 y E2; mientras que las no estructurales son las proteínas restantes. En comparación con los otros géneros de la familia *Flaviviridae*, los *Pestivirus* codifican dos proteínas únicas N^{pro} y E^{ns} (Ridpath, 2010).

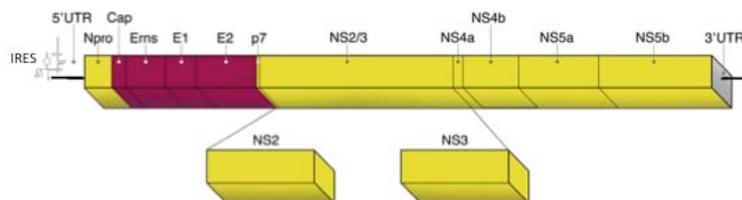


Figura 1.2 Organización del genoma del vDVB. Las proteínas estructurales se muestran en color magenta y las proteínas no estructurales en amarillo. Las regiones 5' y 3'UTR contienen secuencias y motivos estructurales que se requieren para la replicación del ARN y el inicio de la traducción. Modificado de Neil JD / *Biologicals* 41 (2013) 2-7.

1.2.4 Proteínas virales

1.2.4.1 Proteínas estructurales

- La proteína C, es una proteína de 120 aminoácidos con un peso de 14 kDa, que forma la cápside que rodea el genoma del virión. Es una proteína rica en aminoácidos básicos con un 21% de lisina. Es liberada de la poliproteína por proteasas virales y celulares. En el extremo amino terminal el corte es realizado por la proteasa N^{pro} y el extremo carboxilo terminal es liberado por una proteasa celular que corta el sitio entre los aminoácidos Ala 267 y Asp 268 (Heimann *et al.*, 2006). Esta proteína tiene un papel importante en el empaquetamiento del ARN y la morfogénesis del virión (Murray *et al.*, 2008).
- La proteína E^{ns}, anteriormente conocida como E0 o gp44/48, es una de las tres glicoproteínas de envoltura, con un peso de 44 a 48 kDa. Está glicosilada y es liberada de la poliproteína por una peptidasa señal al igual que las proteínas E1, E2 y p7 (Lackner *et al.*, 2004). Forma un homodímero cuyas subunidades están unidas por puentes disulfuro (Langedijk *et al.*, 2002). Carece de un sitio de anclaje típico a la membrana, es decir, un dominio transmembranal; sin embargo, la porción carboxilo terminal (de 56 aminoácidos) tiene la capacidad de anclarse a la membrana (Tews *et al.*, 2009). De las tres glicoproteínas, es la que tiene el primer contacto con la célula por unión a los glicosaminoglucanos, aunque no es fundamental para la entrada a la célula (Wegelt *et al.*, 2009). Es secretada por exocitosis en células infectadas, aunque la mayor parte de la proteína sintetizada es retenida en el interior de la célula y unida a la envoltura viral, ya que se asocia a la membrana celular a través de su extremo carboxilo quedando como proteína unida a la membrana (Fetzer *et al.*, 2005). Induce la producción de anticuerpos con una actividad neutralizante débil (Boulangier *et al.*, 1991). Se le ha atribuido función de RNAsa en el espacio extracelular teniendo la capacidad de regular la síntesis de ARN de la célula infectada. Se ha descrito que la función de la E^{ns} secretada previene la inducción del interferón β (Iqbal *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha descrito que mutaciones en la proteína combinada con la proteína N^{pro} pueden prevenir infecciones persistentes en fetos ya que ambas

proteínas contribuyen al bloqueo de la inducción de interferón tipo I, favoreciendo la infección viral (Meyers *et al.*, 2007).

- La proteína E1, también conocida como gp33 es una glicoproteína integral de membrana de 195 aminoácidos con un peso de 33 kDa. Contiene de 2 a 3 sitios de N-glicosilación y dos regiones hidrofóbicas que sirven como sitio de anclaje a membrana, forma heterodímeros con la proteína E2 unidos por medio de enlaces disulfuro (Weiland *et al.*, 1990).
- Proteína E2, también conocida como gp53 es la principal glicoproteína integral de membrana con un peso de 55 kDa y una longitud de 375-400 aminoácidos que contiene de 4 a 6 sitios de N-glicosilación, forma homodímeros y heterodímeros con la proteína E1 unidos por puentes disulfuro. Se ha demostrado que la formación de los heterodímeros E1-E2 es esencial para la entrada del virus a la célula (Ronecker *et al.*, 2008). El gen que codifica para esta proteína contiene una región variable altamente mutable que genera cambios antigénicos dando lugar a diversas cepas del vDVB (Xue *et al.*, 1990). E2 posee el principal epítipo neutralizante e inmunodominante, es decir, tiene la mayor capacidad de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes (Donis *et al.*, 1988). Es esencial para la infectividad del virus, así como para determinar el tropismo del virus en cultivos celulares (Liang *et al.*, 2003).

1.2.4.2 Proteínas no estructurales

- La proteína N^{pro} o p20 tiene un peso de 20 kDa, está compuesta por 168 aminoácidos y es la primera en ser liberada de la poliproteína. La porción amino terminal de la proteína codifica una serina proteasa, responsable del corte entre su carboxilo terminal y la siguiente proteína, la proteína C; es decir, es una autoproteasa responsable de su liberación de la poliproteína y de la cápside (Wiskerchen *et al.*, 1991; Rüménapf 1993). Es única del género *Pestivirus* y estudios de ésta proteína sugieren que tiene función en la inmunosupresión de individuos infectados al bloquear la actividad del factor regulador de interferón 3

(IRF3), evitando así la producción de interferón tipo I (Hilton *et al.*, 2006; Seago *et al.*, 2007).

- p7, es una proteína de 7 kDa codificada por una secuencia del genoma ubicada entre las secuencias de E2 y NS2-3. La escisión entre E2 y p7 se da por una peptidasa señal de la célula hospedadora, en ocasiones esta escisión se produce de manera incompleta resultando en la proteína E2-p7. Se sabe que la proteína p7 se requiere para la producción de virus infecciosos (Harada *et al.*, 2000), también la porción carboxilo terminal funciona como una secuencia señal para la translocación de la proteína NS2 a la membrana (Agapov *et al.*, 2004). Estudios sobre la proteína p7 del virus de la Hepatitis C, un virus del género *Hepacivirus* que al igual que los otros *Pestivirus* pertenece a la familia *Flaviviridae*, sugieren que puede tener una función en el ensamblaje y entrada del virus al formar un canal iónico en la membrana (Griffin *et al.*, 2003). Aún no es claro si la proteína p7 es estructural o no estructural (Elbers *et al.*, 1996).
- NS2-3 o p125, es una proteína multifuncional de 1300 aminoácidos. En los *Pestivirus* es la proteína más conservada (Bolin y Ridpath, 1998). Está formada por la unión de las proteínas NS2 y NS3, y su escisión determina el biotipo del vDVB y así, su citopatogenicidad en cultivo celular. La región N-terminal es hidrofóbica lo que sugiere un papel en el anclaje de la membrana, el dominio colindante tiene un “dedo” de zinc rico en cisteína; los 146 aminoácidos en la región C-terminal del dedo de zinc forman un dominio con actividad de serina proteasa responsable de la escisión del resto de la poliproteína en proteínas no estructurales. El siguiente par de dominios tienen actividad de ATPasa y helicasa necesarios para la replicación del ARN (Andrew *et al.*, 2012). Adicionalmente, la proteína NS2-3 participa en el ensamblaje de partículas virales y es requerida para la producción de partículas virales infecciosas (Agapov *et al.*, 2004). Es una proteína muy estudiada debido a que se han encontrado alteraciones genéticas que resultan en la separación de la proteína en NS2 y NS3 o la duplicación de NS3. De los *Pestivirus*, el vDVB es el único en donde la presencia de NS3 es

sugerente de una cepa citopática, no así para el vFPC y el vEF en donde la presencia de la proteína NS3 no corresponde necesariamente a la presencia de efecto citopático. Los animales infectados o vacunados con virus modificados desarrollan una respuesta humoral contra ésta proteína, la cual es considerada responsable de las reacciones cruzadas con los vEF y vFPC (Potgieter, 1995).

- NS2 o p54, es una proteína hidrofóbica con función de cisteína proteasa, con un peso de 54kDa. Es responsable, en determinados casos del procesamiento de NS2-3. La incorporación de un único aminoácido dentro de NS2 en la cepa vDVB denominada como CP7, es determinante para inducir el procesamiento eficiente de la NS2-3, y la expresión continua de NS3, que como se mencionó con anterioridad está asociada al efecto citopático del virus; por lo tanto esta proteína es un factor clave en el control de la patogenicidad del vDVB (Kummerer y Meyers 2000; Langedijk *et al.*, 2002) .
- NS3 o p80, es una proteína con un peso de 80 kDa que se expresa en todas las cepas citopáticas, surge a partir de la escisión de la proteína NS2-3. La tercera parte de la porción carboxilo terminal codifica una serina proteasa que funciona con la proteína NS4A para mediar el procesamiento de todos los sitios de escisión. Es responsable de los cortes que se hacen desde ella hacia adelante en la poliproteína, es decir, escinde su propio extremo carboxilo terminal, entre NS3 y NS4A, NS4A y NS4B, NS4B y NS5A, y NS5A y NS5B, pero no es responsable del corte en NS2-3 (Xu *et al.*, 1997); son las proteasas celulares las que realizan las demás digestiones proteicas (Murphy *et al.*, 1999). Forma parte del complejo de replicación; su dominio carboxilo terminal codifica una ARN helicasa y una nucleótido trifosfatasa, que son esenciales para la replicación del ARN (Gu *et al.*, 2000). Es considerada una proteína marcadora para el vDVB citopático (Becher *et al.*, 2002).
- NS4A o p10, es una proteína con una secuencia de 64 aminoácidos de 7kDa. Funciona como un cofactor de la proteasa de NS3 (Tautz *et al.*, 1997).

- NS4B o p38, proteína de 33kDa que participa en la citopatogenicidad viral, es decir, que interviene en el cambio de un virus citopático a uno no citopático, además forma parte del complejo de replicación (Qu *et al.*, 2001).
- NS5A o p58, es una fosfoproteína de 55kDa asociada a cinasas celulares y forma parte del complejo de replicación (Reed *et al.*, 1998).
- NS5B o p75, proteína de 75-81kDa la cual es necesaria para el ensamblaje y la liberación de las partículas virales de la célula hospedadora (Ansari *et al.*, 2004). Se requiere para la replicación viral (Tautz *et al.*, 1999) ya que posee actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Andrew *et al.*, 2012) debido a que contiene la secuencia GDD (Gly-Asp-Asp) común en todas las polimerasas (Xu *et al.*, 1997).

1.2.5 Genotipos

Los vDVB son particularmente heterogéneos y se encuentran agrupados en dos especies reconocidas hasta ahora, vDVB-1 y vDVB-2. Esta heterogeneidad se debe a la variabilidad inherente al tener una ARN polimerasa que carece de actividad de exonucleasa, útil para corregir las bases mal incorporadas, ocasionando una frecuencia alta de sustitución base. Se ha determinado que introduce 1 error por cada 10^4 nucleótidos polimerizados, por lo que en cada evento de replicación viral existen mutaciones puntuales y en consecuencia se pueden producir cambios no sinónimos en la progenie viral importantes para la patogénesis y evolución viral (Flint *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, a las poblaciones de virus ARN se les ha acuñado el término de cuasiespecies para describir el concepto de variabilidad genética (Donis, 1995).

El impacto que tiene la heterogeneidad del vDVB se observa en las diferencias en el genotipo, el biotipo y la virulencia entre las cepas. Se piensa que la acumulación de mutaciones puntuales en el tiempo ha derivado en la

segregación del vDVB en especies genotipos distintos (Ridpath *et al.*, 1994; Brownlie *et al.*, 2000). El salto de especie crea otra oportunidad para la diversificación, ya sea por la adaptación al nuevo hospedador o por deriva génica. Sin embargo, el vDVB aislado de otras especies como cerdos y ovejas tiene características biológicas y antigénicas similares a los aislados a partir de bovinos (Paton, 1995). Otro evento que favorece esta heterogeneidad viral es la recombinación en donde ciertas secuencias de ARN de la célula hospedadora son insertadas en la secuencia de nucleótidos de la secuencia viral, algunas veces acompañadas de duplicaciones o cambios en las secuencias virales o ambos (Goens 2002; Meyers *et al.*, 1996).

En un principio, la clasificación del vDVB se basó en estudios filogenéticos (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994); y caracterizaciones posteriores de las cepas virales de los dos genotipos demostraron que existen diferencias antigénicas entre vDVB (Ridpath *et al.*, 2000). Aunque estas diferencias antigénicas pueden ser utilizadas para diferenciar entre genotipos, la relación que hay entre las secuencias de nucleótidos es el criterio más fiable. Las diferencias entre los genomas del vDVB-1 y vDVB-2 no solo se encuentran en una región en particular, sino que también pueden ser encontradas a lo largo de todo el genoma (Bolin, 1995). Debido a lo anterior, para la caracterización de los vDVB, así como los *Pestivirus* tentativos se ha utilizado la región no codificante 5'UTR y las regiones codificantes N^{pro} y E2 (Vilcek *et al.*, 2001).

La región 5'UTR es una región altamente conservada entre los *Pestivirus* que no codifica ninguna proteína, sin embargo, contiene tres regiones variables denominadas V1, V2 y V3 (Deng y Brock, 1993). Debido a esto es común utilizarla para la detección y caracterización del vDVB; por un lado las regiones conservadas permiten el diseño de sistemas de detección denominados pan-pestivirus (Vilcek *et al.*, 1994), y por otro lado las regiones variables permiten identificar las especies del grupo de los *Pestivirus* (Letellier y Kerkhofs, 2003). Adicionalmente, se ha demostrado que las secuencias de las regiones V1, V2 y V3

son palindrómicas y forman una estructura tallo-bucle característica de cada *Pestivirus*; las mutaciones en dichas regiones se han denominado sustituciones de nucleótidos palindrómicos (por sus siglas en inglés) y las variaciones en estos sitios son consideradas útiles para la genotipificación de diversos aislados virales (Harasawa y Giangaspero, 1998).

Análisis filogenéticos del vDVB sugieren que existen subgrupos dentro de los genotipos vDVB-1 y vDVB-2. El vDVB-1 es particularmente diverso, con por lo menos 16 subgenotipos (vDVB-1a, vDVB-1b, vDVB-1c, vDVB-1d, vDVB-1e, vDVB-1f, vDVB-1g, vDVB-1h, vDVB-1i, vDVB-1j, vDVB-1k (Vilcek *et al.*, 2001) vDVB-1l (Kadir *et al.*, 2008; Jackova *et al.*, 2008), vDVB-1m (Xue *et al.*, 2010), vDVB-1n, vDVB-1o (Nagai *et al.*, 2008), vDVB-1p (Xue *et al.*, 2010)). En contraste, mientras que en el caso del vDVB-2 se han descrito solo tres subgenotipos (vDVB-2a, vDVB-2b y vDVB-2c) (Flores *et al.*, 2002; Jenckel *et al.*, 2014), además de las cepas virales que conforman el grupo propuesto como vDVB-3.

1.2.6 Biotipos

Cada genotipo puede tener dos biotipos, clasificados de acuerdo a su actividad en cultivo celular, sin considerar la capacidad para producir enfermedad en el hospedador, es decir, la citopatogenicidad *in vitro* no está correlacionada con la virulencia *in vivo*. Los biotipos son el citopático (CP), el cual produce vacuolización citoplasmática (lang, 2006) y muerte celular, y el no citopático (NCP) que se replica sin producir daño o modificación en la morfología celular (Thiel *et al.*, 1996; Lértora 2003). De los dos biotipos, a nivel mundial el NCP es el que está distribuido en mayor proporción en el ganado (Pellerin *et al.*, 1994), causando más del 90% de las infecciones (Dubovi, 1992), además de ser el único biotipo capaz de establecer persistencia en los animales, es decir, genera animales PI (Kirkland *et al.*, 1993; Baker 1995; Bolin y Ridpath 1992); esto se debe a que el virus tiene la capacidad de evadir la inducción de interferón tipo I en el feto (Charleston *et al.*, 2001). Por el contrario, el virus CP se encuentra en la minoría de los casos y por lo general está asociado con brotes de la EM (Brownlie *et al.*, 1984).

Los 2 biotipos del vDVB no se pueden distinguir entre sí por medio de serología (Radostits y Littlejohns, 1988) y se requiere de técnicas más sofisticadas para poder identificar cada uno de los biotipos. Los análisis moleculares de los virus CP y NCP han demostrado que los virus CP se originan de un virus NCP homólogo a través de diversos eventos genéticos, que resultan en la escisión de la proteína NS2-3 en NS2 y NS3.

El evento mutacional más frecuente es la recombinación, en el cual, pequeñas secuencias de ARN de la célula hospedadora se insertan en el genoma de un vDVB NCP (Becker, 2000), una de estas secuencias codifica para la ubiquitina permitiendo su escisión (Flint *et al.*, 2009); este evento ha sido descrito en ambos genotipos (Nagai *et al.*, 2003; Ridpath y Neill, 2000). Otros mecanismos genéticos que derivan en la expresión de NS3 pueden ser duplicaciones de secuencias genéticas del vDVB insertadas en la región NS2-3 codificante (Kummerer *et al.*, 2000), duplicación corriente abajo del gen NS3 (Meyers *et al.*, 1992), expresión de NS3 de un genoma defectuoso (Tautz *et al.*, 1994), mutaciones puntuales en el gen NS2-3 (Kummerer *et al.*, 1998) y reordenamiento genómico del gen p125/p80 (Lambot *et al.*, 1997). Dichos eventos están asociados al desarrollo de la EM, manifestación que se describirá en la sección de patogenia.

Con anterioridad se tenía la idea que la proteína NS2-3 y la proteína NS3 solo se expresaban en el biotipo CP del vDVB, y que en el biotipo NCP sólo se expresaba la proteína NS2-3. Actualmente, por medio de investigaciones en donde utilizan la técnica de *Western blot* se sabe que la proteína NS3 está presente tanto en el biotipo NCP como en el CP. En células infectadas con virus NCP se detecta la proteína NS3 después de 5-6 horas postinfección, aunque a las 24 es indetectable. A diferencia del biotipo CP, en donde la expresión de la proteína NS3 comienza a hacerse evidente a las 8 horas postinfección y se mantiene en altos niveles (Lackner *et al.*, 2004). Por esta razón, se considera que

la diferencia más importante a nivel molecular entre el biotipo CP y el NCP es la expresión de la proteína no estructural NS3 (Gu *et al.*, 2000).

Como se mencionó con anterioridad, la importancia de identificar el biotipo predominante en una población de animales radica en que el vDVB NCP puede establecer una infección persistente en el feto, el cual al nacer estará infectado con la cepa de vDVB a lo largo de toda su vida, a diferencia del vDVB CP que no genera infección persistente. Debido a esto, las cepas virales han sido caracterizadas como cepas de baja o de alta virulencia (Ridpath *et al.*, 2000; Carman *et al.*, 1998; Kelling *et al.*, 2002b). En los Estados Unidos, las cepas del vDVB-2 de baja virulencia han sido utilizadas para producir vacunas activas (Fulton *et al.*, 2003a), y las cepas del vDVB-2 de alta virulencia como cepas de desafío para evaluar la eficacia en la protección inducida por la vacunación (Fairbanks *et al.*, 2003). A la fecha, las cepas de vDVB caracterizadas como más virulentas pertenecen al vDVB-2 (Sagar *et al.*, 2008).

1.2.7 Replicación viral

El virus tiene tropismo por linfocitos, macrófagos, células epiteliales (Lértora *et al.*, 2003; Bielefeldt-Ohmann 1983; Hewicker-Trautwein 1997) y células germinales de ambos sexos (Brownlie *et al.*, 2000). La entrada del vDVB a células de origen bovino es un proceso de múltiples pasos que involucran la unión del virus a receptores celulares específicos, internación y fusión de membranas. La unión del virus a las células del hospedador involucra las glicoproteínas virales E^{ns}, E1 y E2 (Liang *et al.*, 2003). La proteína E^{ns} es la primer proteína en interactuar con los glicosaminoglucanos de la superficie celular (Iqbal *et al.*, 2000), mientras que E2 lo hace con proteínas de membrana (Xue *et al.*, 1993) como el CD46 (Maurer *et al.*, 2004) y LDLr (*low-density lipoprotein receptor*) (Agnello *et al.*, 1999), siendo éstos los receptores identificados para el vDVB. Una vez que el virus interactúa con los receptores, ingresa a la célula por medio de endocitosis a través de la formación de vesículas cubiertas de clatrina. La membrana de la vesícula endocítica se fusiona con la envoltura viral, en un proceso de fusión inducido por la disminución del pH endosomal y mediado por glicoproteínas virales

(Lecot *et al.*, 2005). Después de dicho evento le sigue el proceso de desnudamiento, el cual ocurre cuando la cápside es removida por medio de enzimas celulares y el material genético del virus es liberado en el citoplasma (Sagar *et al.*, 2008).

El ARN de cadena positiva puede ser traducido sin transcripción previa, es decir, actúa como un ARN mensajero. Como resultado de la traducción del mensajero se genera una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos que es procesada y escindida para dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus, este proceso es resultado de la actividad de proteasas tanto celulares como virales. Las proteínas escindidas, tanto estructurales como no estructurales, contribuyen al proceso de replicación del ARN (Purchio *et al.*, 1984). Durante este proceso, se realiza la síntesis de la cadena de ARN negativa que servirá como molde para la síntesis de la cadena de ARN positiva; se han detectado cadenas de polaridad positiva y negativa desde las 4 a 6 horas postinfección, a partir de este momento la tasa de síntesis de ARN de cadenas positivas se incrementa rápidamente, mientras que la síntesis de ARN de cadenas negativas permanece constante (Murphy *et al.*, 1999).

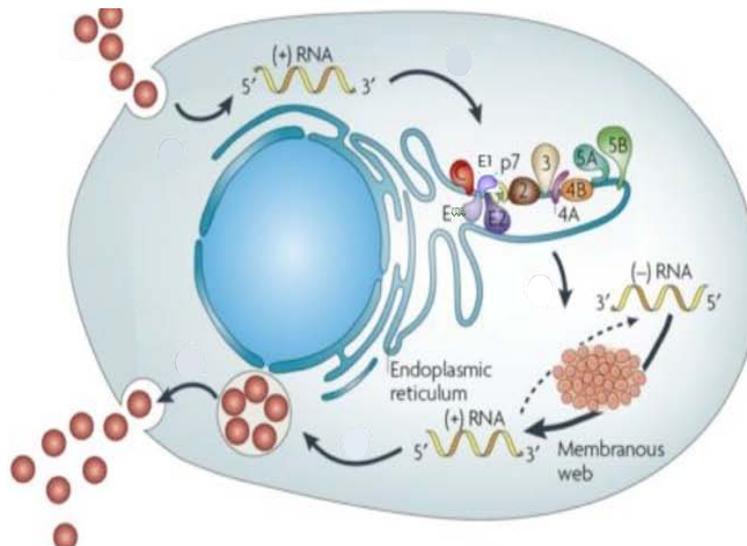


Figura 1.3 Ciclo de replicación del vDVB. Modificado de Moradpour D. *et al.* 2007, *Nature Reviews Microbiology* 5, 453-463

El ensamblaje de las partículas virales recién sintetizadas se realiza en el retículo endoplásmico (Grummer *et al.*, 2001) y adquieren su envoltura a partir de las membranas intracelulares de las vesículas citoplasmáticas; las partículas virales son transportadas a través de la vía secretoria y liberadas por exocitosis (Sagar *et al.*, 2008).

1.3 Patogenia y patogénesis

1.3.1 Hospedador

El hospedador principal del vDVB son los bovinos, que constituyen la principal fuente de infección y reservorio del virus, ya que los animales infectados eliminan grandes cantidades de virus a través de sus secreciones en forma constante y durante toda su vida. Sin embargo, tiene la capacidad de cruzar la barrera de especie infectando naturalmente a los ungulados del orden *Artiodactyla*, es decir, porcinos, ovinos, caprinos, alpacas, llamas, camellos, búfalos de agua, antílopes y venados (Peterhans *et al.*, 2010; Nettleton 1995).

1.3.2 Transmisión

En una explotación ganadera existen dos tipos de fuentes de infección, los animales PI y los animales que cursan un proceso agudo de la infección. Ambos pueden transmitir la enfermedad por vía horizontal o vertical.

- Transmisión horizontal

Los animales PI son considerados la mayor fuente de infección (Houe, 1999) debido a que a lo largo de toda su vida eliminan el virus en altas concentraciones por medio de fluidos corporales (Bruschke *et al.*, 1998). Por lo tanto, en rebaños infectados la principal ruta de transmisión horizontal hacia animales susceptibles son propagadas de forma directa (contacto directo entre un animal infectado y un animal susceptible) e indirecta (contacto entre un animal susceptible y el virus por medio de fómites) por animales PI (Wentink *et al.*, 1991).

Los animales que cursan una infección aguda tienen menor probabilidad de transmisión en comparación con los PI, ya que la eliminación del virus es intermitente y en bajas concentraciones (Moerman *et al.*, 1993, Edwards 1997).

Transmisión directa, la infección viral puede ser propagada por el contacto directo de animales susceptibles con secreciones corporales como descargas nasales, saliva, orina, secreciones uterinas, líquido amniótico, heces, semen y leche; donde tan sólo una hora de contacto es necesaria para que se lleve a cabo la transmisión (Traven *et al.*, 1991). También se puede transmitir el virus por medio del uso de semen contaminado para inseminación artificial y por la transferencia de embriones contaminados (Brock *et al.*, 1991).

Transmisión indirecta, por medio del uso de material contaminado como guantes de palpación rectal (Lang-Ree *et al.*, 1994), agujas y pinzas de nariz (Gunn, 1993). Además, el vDVB también es un contaminante del SFB, un componente empleado en los cultivos celulares como factor de crecimiento, por esta razón los productos biológicos como las vacunas, también pueden estar contaminados con el vDVB (Loken *et al.*, 1991b; Barkema *et al.*, 2001; Falcone *et al.*, 2003a; Pastoret 2010; Falcone 1999).

- Transmisión vertical

La transmisión vertical ocurre cuando las hembras gestantes susceptibles se infectan con el vDVB, el cual tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria en animales seronegativos e infectar al feto. En el feto, el desarrollo de la infección depende de la etapa de gestación en la cual la hembra es infectada y el biotipo viral. En el caso de animales PI se considera que siempre tendrán terneros PI (Moennig y Leiss, 1995) y en animales que cursan una infección aguda la probabilidad de una transmisión vertical es mayor que la horizontal (Lindberg y Houe, 2005).

El periodo de incubación es de 3-7 días y los animales pueden permanecer virémicos de 4-15 días después de la infección inicial (Brownlie, 2005).

1.3.3 Patogenia

La ruta normal de entrada del vDVB es por la mucosa nasal o bucal, después del contacto directo con las secreciones de animales infectados la replicación viral ocurre en células epiteliales y en tonsilas palatinas en donde los linfocitos propagan el virus por todo el cuerpo (Bruschke *et al.*, 1998a; Bruschke *et al.*, 1998b).

La enfermedad producida por el vDVB tiene diferentes manifestaciones clínicas que incluyen variantes reproductivas, respiratorias, síndrome hemorrágico, enfermedad de las mucosas y mala condición de animales persistentemente infectados. Factores como el genotipo, biotipo y virulencia de cada una de las cepas; así como la edad, estado fisiológico y el estado inmunológico del hospedador determinarán el tipo de presentación de la enfermedad; los factores virales relacionados con la cepa o el biotipo, así como los relacionados con el hospedador son la causa de una amplia gama de signos clínicos y lesiones.

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

Diarrea viral bovina (Infección en un animal inmunocompetente):

- Infección subclínica. Del 70 al 90% de infecciones en bovinos adultos susceptibles son subclínicas; los animales pueden tener hipertermia leve y leucopenia, seguido por la producción de anticuerpos neutralizantes (Baker 1987) .
- Infección aguda. Se desarrolla en bovinos susceptibles (seronegativos), inmunocompetentes (Sagar *et al.*, 2008), en especial en animales de 6 a 24 meses de edad (Ramírez *et al.*, 1999) y es causada en su mayoría por el vDVB NCP (Baker, 1995). Se caracteriza por pirexia, leucopenia 3-7 días post-infección y en este periodo la recuperación del virus en sangre o secreciones nasales es limitada (Brownlie *et al.*, 2000). Los animales susceptibles además pueden presentar diarrea, depresión, inapetencia,

descargas oculares y nasales, erosiones en mucosa oral, y en el caso de vacas lecheras disminuye la producción láctea. Debido a la inmunosupresión que causa la infección por vDVB la enfermedad en los animales se puede manifestar además con infecciones respiratorias e intestinales oportunistas (Murphy *et al.*, 1999). En estos animales puede haber seroconversión y los anticuerpos neutralizantes son detectados en suero de 3 a 4 semanas después de la infección (Radostits y Littlejohns,1988).

- Infección en bovinos no gestantes. En la mayoría de los casos las infecciones en bovinos susceptibles no gestantes son subclínicas, pero dependiendo de la cepa y genotipo pueden llegar a causar la enfermedad (Pellerin *et al.*,1994). El virus se puede detectar en la mayoría de las secreciones a partir de los 4-10 días post infección de manera intermitente y en bajos niveles (Brownlie *et al.*, 1987).
- Infección en bovinos gestantes (trasplacentaria /intrauterina). El vDVB tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria e infectar al feto. La infección congénita resulta en un amplio espectro de anomalías como reabsorción embrionaria, aborto, momificación, malformaciones congénitas, nacimiento de terneros débiles, de bajo peso y tamaño, nacimiento de animales persistentemente infectados (Radostits y Littlejohns,1988). Los signos clínicos que se pueden observar son: fiebre desde el día 6-9 post infección, inapetencia y lesiones en mucosa. La infección en terneros con frecuencia está asociada con signos respiratorios y gastrointestinales como tos y diarrea que pueden ser el resultado de infecciones concurrentes (Fulton *et al.*, 2000).
 - Infección persistente. Las cepas del vDVB NCP tienen la habilidad de establecer una infección persistente, además de ser el biotipo predominante en la naturaleza y el más aislado a partir de ganado

bovino (Bolin y Ridpath, 1992). Por el contrario, el vDVB CP es capaz de atravesar la placenta e infectar al feto, pero no tiene la capacidad de establecer una infección persistente (McClurkin *et al.*, 1984). El vDVB NCP es el responsable de las infecciones *in útero*, cuando ésta se adquiere entre los días 18 a los 125 de gestación (Kirkland *et al.*, 1993; Fetzer *et al.*, 2005), antes de que ocurra el proceso de reconocimiento entre lo propio y lo no propio. Por esta razón, se produce una infección asintomática al establecerse una tolerancia hacia el vDVB. Los animales PI son virémicos e incapaces de sintetizar anticuerpos o activar linfocitos T contra el vDVB debido a su inmunotolerancia al mismo, pero si los linfocitos T se exponen a cepas heterólogas del vDVB pueden producir anticuerpos neutralizantes contra dichas cepas (Tews *et al.*, 2009).

Los animales PI eliminan grandes cantidades de virus por las secreciones actuando como fuente principal del vDVB para los otros animales. Los animales PI, pueden nacer clínicamente sanos, llegar a edad adulta y reproducirse. De ser así, el virus se sigue replicando durante toda la vida de los animales infectados y es continuamente excretado al medio teniendo la capacidad de transmitirse a hembras susceptibles y fetos, de esta manera la progenie de estos animales siempre será PI (Roeder y Harkness, 1986).

La infección congénita, entre el día 100 y 150 de gestación, resulta en el desarrollo de una serie de defectos congénitos (Grooms, 2006), lesiones fetales o retraso en el crecimiento que tiene como resultado muerte fetal o el nacimiento de animales de bajo peso (síndrome de ternero débil). Los animales con infección congénita con el vDVB tienen el doble de probabilidades de experimentar enfermedad grave durante los primeros 10 meses de vida en comparación con terneros que nacieron libres de anticuerpos contra el vDVB (Munoz-Zanzi *et al.*, 2003). Las lesiones fetales son a menudo manifestaciones de los efectos del virus en la

organogénesis, evidenciados con los defectos congénitos. Durante esta etapa de la gestación la organogénesis está terminada y el sistema inmune es completamente funcional (Murphy *et al.*, 1999).

La infección después de los 150 días de gestación resulta, también, en abortos y el nacimiento de terneros débiles. Los fetos que son infectados en este periodo tienen la capacidad de montar una respuesta inmune contra el vDVB, estos nacen como terneros clínicamente sanos y tienen anticuerpos neutralizantes contra el virus (Braun y Kendrick, 1973).

- Síndrome hemorrágico. Este cuadro está asociado al vDVB 2 y biotipo NCP (Brownlie *et al.*, 2000; Ridpath *et al.*, 2006), se caracteriza por mucosas anémicas con hemorragias petequiales y equimóticas, hipertermia, hemorragia en múltiples sistemas orgánicos, diarrea sanguinolenta, epistaxis, sangrado constante en sitios de inyección, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte (Bolin y Ridpath 1992; Ridpath *et al.*, 2000). Esta signología se atribuye a la trombocitopenia y alteración de la función plaquetaria.

Enfermedad de las mucosas (infección en un animal inmunotolerante). Esta condición (EM) solo ocurre en animales PI, los cuales pueden desarrollar la enfermedad como resultado de una sobreinfección con un vDVB CP homólogo (Brownlie *et al.*, 2000) o heterólogo (Ridpath *et al.*, 1991) de origen exógeno o generada de cambios genéticos o recombinación del ARN de las cepas NCP residentes (Vera *et al.*, 1999); aunque en la mayoría de los casos de la EM, la superinfección con virus CP proviene de la mutación de un virus NCP persistente (Howard *et al.*, 1987; Shimizu *et al.*, 1989; Corapi *et al.*, 1988). Por lo tanto, a partir de los animales con EM se pueden aislar los 2 biotipos. La EM se presenta principalmente en animales jóvenes aproximadamente de 6 a 18 meses de edad, con una patología característica: erosiones en mucosa oral e intestinal de donde se puede aislar el biotipo CP (Brownlie *et al.*, 2000), fiebre, depresión, sialorrea,

diarrea profusa, pérdida de la condición corporal y muerte la cual se produce dentro de los primeros 10 días del comienzo de los signos clínicos; sin embargo, los animales con EM crónica pueden sobrevivir por más de 18 meses con diarrea continua o intermitente y emaciación progresiva (Baker, 1987).

1.4 Inmunidad contra el virus de la diarrea viral bovina

El éxito de la infección por el vDVB está basado en dos estrategias de infección “*hit-and-run*” y “*infect-and-persist*”, es decir, producen lisis y persistencia. La primera de éstas se manifiesta por la presentación de una infección transitoria que da como resultado una respuesta inmunológica contra el vDVB la cual se mantiene a lo largo de la vida del animal. En la segunda estrategia de infección, el virus produce una infección persistente en el feto durante su desarrollo intrauterino, es así como el virus establece una infección caracterizada por inmunotolerancia la cual es específica para la cepa viral infectante; los animales infectados durante este periodo pueden nacer y desarrollarse de manera normal, pero permanecen persistentemente infectados a lo largo de su vida (Peterhans, 2003).

El sistema inmune reacciona a una infección aguda mediante la formación de anticuerpos y la activación de linfocitos T (CD4 y CD8) que reconocen los diferentes tipos de vDVB. Se ha detectado la presencia de anticuerpos neutralizantes desde las primeras dos semanas después del primer contacto con el virus. Sin embargo, la cinética de linfoproliferación es diferente entre biotipos (Howard *et al.*, 1992).

Como se ha mencionado con anterioridad, la infección con el biotipo NCP en animales gestantes antes del día 125 de gestación deriva en el establecimiento de una infección persistente. El prerrequisito para tal infección persistente parece surgir de una inmunotolerancia de linfocitos T y B específicos (McClurkin *et al.*, 1984). La teoría es que existe una selección negativa o una regulación negativa de linfocitos B y T específicos de vDVB durante la ontogenia, resultando en la

ausencia de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes y células, mediados por la inmunidad al vDVB persistente (Donis y Dubovi, 1987).

Sólo los biotipos NCP son capaces de establecer una infección persistente, mientras que la infección transitoria es causada por ambos biotipos. La diferencia entre el biotipo CP y el NCP es la inducción de interferón (IFN) tipo I en macrófagos. La ausencia de la inducción del IFN que se observa con el virus NCP, es una ventaja para el virus por la incapacidad para inducir apoptosis en células infectadas (Schweizer y Peterhans, 1999). Se ha demostrado que la proteína N^{pro} tiene la capacidad de inhibir la apoptosis inducida por ARN de doble cadena, además de activar la degradación proteasomal de IRF-3, previniendo la activación transcripcional del gen de IFN β (Baigent *et al.*, 2002; Baigent *et al.*, 2004; Hilton *et al.*, 2006). La proteína N^{pro} posee además un motivo de unión al Zn, el cual es esencial para la interacción con IRF-7, reduciendo la expresión del IFN tipo I (Fiebach *et al.*, 2011).

La proteína E^{rns} también desempeña una función en la inhibición de la inducción del Interferon tipo I, pero ésta a diferencia de la proteína N^{pro}, lo hace en células no infectadas (Peterhans y Schweizer, 2013). Adicionalmente, en infecciones *in vitro* de macrófagos con vDVB, éstos reducen la expresión de FcR y C3R por lo cual se disminuye su actividad fagocítica (Welsh *et al.*, 1995).

1.5 Inmunosupresión

Se sabe que el vDVB infecta células del sistema inmunológico como neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B y células presentadoras de antígenos (CPA) (Sopp, *et al.*, 1994) principalmente monocitos, macrófagos y células dendríticas causando inmunosupresión e incrementando la susceptibilidad a infecciones secundarias por patógenos oportunistas; los animales infectados disminuyen la respuesta contra el vDVB y para otros antígenos. Existen datos que indican que el vDVB juega un papel importante en enfermedades de etiología múltiple, un ejemplo de ello es el complejo respiratorio bovino (CRB). El vDVB ha sido aislado

frecuentemente a partir de ganado con neumonía y comúnmente se presenta en infecciones de otros agentes como herpes virus bovino tipo 1 (HVB-1) (Biuk-Rudan, *et al.*, 1999), virus de parainfluenza-3 (PI3) (Fulton *et al.*, 2000), coronavirus bovino (vCoB), virus sincitial respiratorio bovino (vSRB) (Brodersen y Kelling, 1999), *Manhemia haemolytica*, *Pasteurella multocida* (Martin *et al.*, 1990), *Mycoplasma bovis* (Haines *et al.*, 2001).

Además de causar inmunosupresión, el vDVB puede interactuar directamente con otros agentes patógenos para exacerbar los efectos de la infección. Por ejemplo, la infección combinada con *Salmonella dublin* y *S. Typhimurium* (Wray y Roeder, 1987) o el vSRB en macrófagos alveolares produce decremento en las funciones de éstos (Liu *et al.*, 1999). Así como también se ha descrito que tiene sinergismo con el HVB-1 (Potgieter *et al.*, 1984), rotavirus (Kelling *et al.*, 2002a) y el virus de la gastroenteritis transmisible de cerdos (vGET) (Woods *et al.*, 1999).

1.6 Epidemiología

1.6.1 Situación actual

La DVB está enlistada por la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) como una enfermedad de notificación obligatoria (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2008). Es una enfermedad endémica de las poblaciones ganaderas, distribuida alrededor del mundo. El vDVB-1 está distribuido mundialmente (Houe, 1995), el vDVB-2 sólo se ha detectado en Estados Unidos, Canadá y en algunos países de Europa y África, mientras que vDVB-3 o *HoBi-like* se ha detectado en países como Brasil, Australia, Canadá, Estados Unidos (Xia *et al.*, 2011) Italia, Suiza; recientemente detectado en India (Mishra *et al.*, 2014) y Bangladesh (Haider *et al.*, 2014). Se considera una prevalencia mundial del 60-85% y de 1-2% de animales PI (Houe, 1999).

Existen diferencias en la prevalencia de la DVB en cada país, éstas se encuentran relacionadas a diversos factores como la densidad de población, tipo

de explotación, vacunación, comercio de animales, manejo del ganado, manejo de pasturas entre otros. Los vDVB aislados se clasifican basándose en la comparación de secuencias genéticas de la región 5'UTR, N^{pro} (Vilcek *et al.*, 2001) y E2 (Becher *et al.*, 1999); con base en esto, es posible inferir el o los grupos filogenéticos a los que pertenecen el vDVB aislados para poder segregarlos en subgenotipos. Éstos aún no son aceptados por el ICTV; sin embargo, son ampliamente utilizados en estudios de epidemiología molecular. Por lo que diversos países se han dado a la tarea de determinar los subgenotipos predominantes en sus poblaciones ganaderas (Cuadro 1.1).

País	Subgenotipo vDVB-1 predominante															
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
Estados Unidos (Ridpath <i>et al.</i> , 1994)	X	X														
Canadá (Pellerin <i>et al.</i> , 1994)	X	X														
Austria (Vilcek <i>et al.</i> , 2003), (Hornberg <i>et al.</i> , 2009)	X	X		X	X	X	X	X			X					
Suiza (Vilcek <i>et al.</i> , 2004)											X					
Alemania (Tajima <i>et al.</i> , 2001)	X	X	X	X		X	X									
Italia (Falcone <i>et al.</i> , 2003b)		X		X	X	X		X								
Inglaterra (Vilcek <i>et al.</i> , 1999)	X	X							X							
Eslovenia (Toplak <i>et al.</i> , 2004)		X		X		X	X									
España (Arias <i>et al.</i> , 2003)		X	X					X								
India (Mishra <i>et al.</i> , 2004)		X														
Australia (Mahony <i>et al.</i> , 2005)	X		X													
Finlandia (Vilcek <i>et al.</i> , 2004)										X						
Nueva Zelanda (Vilcek <i>et al.</i> , 2001)	X															
Hungría (Vilcek <i>et al.</i> , 2001)		X				X										
Egipto (Vilcek <i>et al.</i> , 2004)										X						
Mozambique (Vilcek <i>et al.</i> , 2004)										X						
China (Xue <i>et al.</i> , 2010)		X										X				X
Japón (Nagai <i>et al.</i> , 2008)														X	X	
Francia (Jackova <i>et al.</i> , 2008)	X	X		X	X						X					
Turquía (Kadir <i>et al.</i> , 2008)	X	X		X		X		X			X					
Argentina (Jones <i>et al.</i> , 2001)	X	X														
Brasil (Otonel <i>et al.</i> , 2014)	X	X		X												
Bélgica (Couvreur <i>et al.</i> , 2002)	X	X														

Cuadro 1.1. Subgenotipos del vDVB-1 en diversos países. En negritas se indica el subgenotipo predominante.

1.6.2 Seroprevalencia

El uso de pruebas serológicas es una herramienta útil para detectar la presencia de anticuerpos contra vDVB en hatos ganaderos; es por esto que ha sido ampliamente utilizada como una técnica diagnóstica por algunos países. Diversos países de la Unión Europea han realizado estudios para determinar la seroprevalencia obteniendo un promedio de 95% en Inglaterra (Paton *et al.*, 1998), 46% en la parte baja de Austria (Rossmannith y Deinhofer, 1998), 64% en Dinamarca (Houe y Meyling, 1991b), 46% en Suecia (Niskanen *et al.*, 1991), hasta un 19% en Noruega (Loken *et al.*, 1991a) y menos de 1% en Finlandia (Nuotio *et al.*, 1999). En estudios realizados en otros países como Polonia, demostraron la presencia de anticuerpos contra vDVB en el 86% de las muestras (Polak *et al.*, 1999); asimismo en Suiza se encontraron anticuerpos anti-vDVB en el 100% de las muestras analizadas (Rufenacht *et al.*, 2000).

En América se ha estimado la seroprevalencia del vDVB en Colombia, detectando una prevalencia del 29.4% en bovinos (Betancur *et al.*, 2007). En el caso de Argentina, se ha determinado que en animales de 6-12 meses una prevalencia de 25.6% a 41.9%, para bovinos de 1-2 años de vida de 45.6% y en animales mayores de 2 años la prevalencia varió entre 48.6 % y 90.7% (Odeón *et al.*, 2001).

Es importante mencionar que no todos los trabajos en los que se detecta la presencia de anticuerpos contra el vDVB se busca identificar animales con infecciones persistentes. Países como Dinamarca, Alemania y Estados Unidos han detectado animales PI en un 53% (Houe y Meyling, 1991a), 45% (Frey *et al.*, 1996) y 15% (Houe *et al.*, 1996) en rebaños respectivamente.

1.6.3 Situación en México

En México, la DVB es reconocida por la Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca y Alimentación (SAGARPA) como una enfermedad endémica y de notificación obligatoria con base en el *Acuerdo*

mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, endémicas y exóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos; sin embargo, la información disponible sobre la incidencia y prevalencia de la DVB es limitada, adicionalmente, no se cuenta con una campaña de control o erradicación de la enfermedad. Existen pocos estudios realizados que demuestran la presencia de anticuerpos contra el vDVB y lo refieren como uno de los causantes de infertilidad en el ganado, pero hasta ahora no se han reportado trabajos de investigación en los que se revele la presencia del virus en animales seronegativos, es decir en los animales PI. En los estudios realizados se ha determinado la seroprevalencia en el trópico húmedo mexicano de un 12.27% (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2007), mientras que en el estado de Morelos se demostró que el 42% de los animales analizados fueron seropositivos (Saldivar *et al.*, 2009), en el estado de Yucatán 14% fueron positivos (Solis-Calderon *et al.*, 2005) y en el norte de Chiapas el 35.1% (Cano *et al.*, 2009). Adicionalmente en otros estudios se ha detectado la presencia del vDVB-1 en muestras de sangre y piel de bovinos (López-Pérez *et al.*, 2014) provenientes del estado de Hidalgo. Asimismo a partir de líneas de cultivo celular, diversos lotes de SFB comerciales, utilizados en la producción de vacunas, y vacunas de uso veterinario para bovino y caninos comercializados en nuestro país se logró identificar al virus vDVB-1a, vDVB-1b y vDVB-2a (Gómez-Romero *et al.*, 2013).

1.6.4 Impacto económico

La infección por el vDVB en animales susceptibles deriva en una amplia gama de manifestaciones clínicas que son perjudiciales para la salud del individuo y como consecuencia en el fin zootécnico de los animales. La enfermedad genera pérdidas económicas significativas para la industria ganadera, atribuidas a la pérdida de la producción láctea, disminución en el rendimiento reproductivo, retraso en el crecimiento, defectos congénitos, incremento en la predisposición a enfermedades concomitantes e incremento de la mortalidad en animales jóvenes (Houe, 2003). Algunos factores importantes que pueden incrementar la magnitud de las pérdidas son el estado inmunológico del ganado, el estado fisiológico de los

animales y la virulencia del virus. Es por esto que es difícil evaluar el impacto económico de las infecciones causadas por el vDVB. Esto ha llevado a que algunos países europeos realicen estudios, tanto epidemiológicos como de costo-beneficio, con el propósito de planificar programas de erradicación y control de la DVB respectivamente (Bitsch and Ronsholt, 1995; Curwen, 1999; Houe, 1995; Houe, 1999).

El impacto económico de una enfermedad consiste en el cálculo de las pérdidas de producción, gastos por tratamientos y medidas de prevención (McInerney *et al.*, 1992). Las pérdidas en la producción dependen del tamaño de la población, incidencia de la infección y por supuesto la magnitud de todas las diferentes manifestaciones físicas de la enfermedad (Bennett *et al.*, 1999). Sin embargo, el cálculo de la pérdida en los brotes por DVB son significativamente variables. Es por eso que la mayoría de los cálculos deben considerarse como estimaciones conservadoras (Houe, 2003).

Los países que han realizado estudios en los que se estiman las pérdidas económicas causadas por la infección por el vDVB, como Dinamarca, han calculado que el impacto económico asciende a los 20 millones de dólares por cada millón de partos (Houe, 1993), mientras que en Inglaterra y Nueva Zelanda se estimó una pérdida de 46 millones de dólares (Bennett *et al.*, 1999) y NZ\$44.5 millones por año respectivamente (Heuer *et al.*, 2007).

Debido a esta situación, en diversos países de Europa se han aplicado, de manera exitosa, programas de erradicación que ofrecen un enfoque alternativo para el control de la DVB a nivel granja (Lindberg *et al.*, 2006); aunque para el establecimiento de medidas de control se requiere de una aportación financiera extra, todas las opciones para el control de la enfermedad son económicamente favorables en comparación con el costo de una infección por el vDVB (Reichel *et al.*, 2008).

1.6.5 Diagnóstico

El objetivo principal del diagnóstico del vDVB es la detección y remoción de bovinos PI, que como se mencionó con anterioridad son la principal fuente de infección y reservorio del virus. El diagnóstico se basa en la detección de componentes virales o la evidencia de la exposición al virus.

El tipo de muestra puede variar dependiendo de la técnica a utilizar, ya que el vDVB se puede encontrar en diversos órganos como bazo, hígado, pulmón o riñón, así como en lesiones de intestino delgado o en placas de Peyer; asimismo se pueden utilizar muestras de secreciones nasales, heces, orina, leche, suero, plasma o semen.

- *Aislamiento viral en cultivo celular*

El vDVB tiene la capacidad de replicarse en diferentes linajes celulares; entre los más sensibles están los cultivos de bajo pasaje de células de riñón de bovino, células de cornetes nasales y de testículo (Edwards, 1990). Es necesario asegurarse que el SFB utilizado como suplemento en estas líneas celulares esté libre del vDVB y anticuerpos contra el mismo. La sensibilidad de esta técnica depende del volumen, concentración del inóculo y periodo de incubación. En el caso del virus CP, las botellas de cultivo celular deberán revisarse a diario con el propósito de identificar el efecto citopático. En el caso del virus NCP por lo general se fija el cultivo celular y se detecta la presencia del virus con anticuerpos anti-vDVB marcados con flourocromos o una enzimas como la peroxidasa (Sandvik, 1999). El aislamiento viral se puede realizar a partir de suero, plasma, capa flogística, fetos abortados, piel, secreciones nasales y semen (Saliki y Dubovi, 2004).

- *Inmunohistoquímica (IHQ)*

La IHQ se realiza en tejido fijado en formalina y embebido en parafina. Es una técnica que permite la identificación de antígenos virales a través del uso de anticuerpos específicos marcados, éstos al unirse al antígeno generarán una tinción microscópicamente visible en el sitio de unión, por lo general se utilizan anticuerpos unidos a peroxidasa aunque con anterioridad se utilizaba fluoresceína

(Haines y Chelack, 1991). Adicionalmente, es una técnica que permite asociar el antígeno viral con tipos celulares y lesiones histológicas (Brownlie *et al.*, 2000).

- *Inmuno ensayo enzimatico (ELISA)*

Es una prueba independiente de cultivos celulares. Se basa en el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales que capturan el antígeno viral; por lo que la especificidad de esta prueba esta determinada por la elección del antígeno viral seleccionado, que pueden ser partículas virales purificadas, extractos de cultivos celulares inoculados con el virus, antígenos virales simples o proteínas virales recombinadas producidas en bacterias. La mayoría de los ELISAs empleados para la detección del virus son de tipo sándwich enfocados a la detección de proteínas como NS2-3, E^{ms}, o E2 (Holmquist *et al.*, 2002).

- *Detección de ARN viral*

La Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) es una técnica que permite detectar ARN viral. Gracias a la amplificación de fragmentos conservados del genoma del vDVB y posterior análisis de éstos se ha podido segregar el vDVB en genotipos y subgenotipos (Liu *et al.*, 2009a). Por lo general, se utilizan iniciadores que amplifiquen regiones conservadas del genoma viral como la región 5'UTR o p80 que codifica para la síntesis de la proteína NS3 (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2008). Las muestras que se pueden someter a esta prueba son suero, sangre, leche así como órganos de animales sospechosos. Otra aplicación diagnóstica para esta prueba es el monitoreo de líneas celulares y sueros fetales, los cuales pueden estar contaminados con el vDVB NCP (Bolin *et al.*, 1991). Se debe tener especial cuidado en la interpretación de los resultados, ya que la detección de ARN viral no implica que el virus presente en la muestra sea infeccioso.

1.6.6 Control y erradicación

La epidemiología y la patología de la infección causada por los diferentes tipos de vDVB son complejas, por lo tanto el control de la enfermedad es complicado. La clave para el control y erradicación de la DVB es la detección y eliminación de animales PI; para esto, es indispensable contar con un monitoreo constante de los animales utilizando técnicas de detección e identificación del vDVB para un diagnóstico oportuno y eficaz, asimismo permiten establecer el estado zoonosanitario de la población ganadera monitoreada. El objetivo de utilizar un programa de control es minimizar las pérdidas económicas al reducir la incidencia de animales PI y con esto la circulación del vDVB (Laureyns *et al.*, 2010); adicionalmente, en algunos países la erradicación de la se basa en programas de control de la DVB sin vacunación y con vacunación (Houe, 2006; Lindberg y Alenius, 1999).

Los programas de erradicación sin vacunación consisten en la detección y eliminación de animales PI; para esto, se realiza un muestreo individual de todos los animales del hato incluyendo a todos los recién nacidos, los animales deben ser muestreados hasta un año después de que es identificado el último PI, lo que significa que el periodo de muestreo se prolonga por un año cada vez que un PI es detectado. Después de removerse del hato todos los animales positivos es recomendable el monitoreo continuo que consiste en un muestreo cada 6 meses (Laureyns *et al.*, 2010) para que la realización de pruebas diagnósticas permitan establecer el estado zoonosanitario de la población ganadera monitoreada. (Houe, 2006, Lindberg *et al.*, 2006). En este programa, las medidas de bioseguridad juegan un papel importante; por lo que se implementan medidas como el control en el desplazamiento de animales entre hatos, la aplicación de cuarentenas a los animales que se deseen ingresar al hato por primera vez, uso de semen certificado libre del vDVB y control de ingreso del personal (Lindberg *et al.*, 2006); incluso en países como Escocia, la legislación actual sustenta que para poder realizar la venta de animales, los propietarios de los mismos tienen que declarar estatus del hato. De esta forma los posibles compradores tienen la opción de comprar ganado proveniente de hatos libres de la enfermedad o en su defecto

implementar una cuarentena apropiada y el uso de técnicas diagnósticas para el ganado obtenido a partir de hatos que no son libres de DVB (Gates *et al.*, 2013). Estos programas de erradicación se empezaron a implementar en países como Dinamarca, Noruega, Finlandia y Suecia en la década de los 90's (Gunn *et al.*, 2005; Valle *et al.*, 2005). Los países que están bajo un programa de erradicación han demostrado que ésta, rara vez se puede alcanzar si se carece de una legislación que la regule (Bitsch *et al.*, 2000).

Los programas de erradicación con vacunación, consisten en la implementación de esquemas de vacunación destinados al control y posteriormente la erradicación de la DVB. La justificación del uso de vacunas es que permite limitar la diseminación de la infección dentro de una población y reducir la presentación de los signos clínicos de la enfermedad en animales infectados (Lindberg y Houe, 2005); asimismo, se pretende reducir la tasa de abortos, malformaciones congénitas e infecciones fetales que resultan en el nacimiento de terneros PI (Van Oirschot, 2001). Para que el control de la enfermedad por medio de la vacunación sea efectivo, las vacunas utilizadas deben conferir niveles de protección tanto a ganado gestante como a sus productos y que dicha protección sea contra los genotipos circulantes (Kelling, 2004); ya que debido a la inherente heterogeneidad en las cepas del vDVB la vacunación enfrenta diversos retos (Ridpath, 2013). Es importante tomar en cuenta que la vacunación utilizada como única medida de control no es suficiente para la reducción de la presentación de la DVB o su eliminación (Lindberg y Houe, 2005); sin embargo, es una herramienta efectiva para reducir la propagación del virus. En el diseño de los programas de vacunación se deben tomar en cuenta diferentes factores como el estrés, que reduce la capacidad de los animales de responder a la vacunación, y las diferencias en la respuesta inmunológica relacionadas con la edad y estado fisiológico; además, es necesario considerar la gran heterogeneidad que tienen las cepas del vDVB, por lo que es necesario establecer programas para neonatos, animales de engorda, de reemplazo y en producción (Ridpath, 2010).

El control de la DVB es complejo y requiere un esfuerzo constante. En áreas en donde se tenga una alta densidad de población ganadera y alta

prevalencia de DVB, el control de la DVB se basa en cuatro principios: estricta bioseguridad, monitoreo permanente, desecho de animales PI y por último la vacunación que es recomendada como una herramienta suplementaria contra la reinfección (Laureyns *et al.*, 2010).

1.6.7 Vacunas

Debido al impacto que la DVB tiene en la salud de los animales infectados y por ende en el incremento en los costos de producción de un hato, se hace uso de sistemas de vacunación como parte de un programa de control-erradicación. La vacunación contra el vDVB se inició desde los años 60's y ha demostrado ser una herramienta eficaz mientras sea aplicada en condiciones controladas (Deregt, 2005).

Como se mencionó con anterioridad, el objetivo de la vacunación contra el vDVB es la prevención de la infección trasplacentaria, y prevenir el desarrollo de la enfermedad después de estar en contacto con el vDVB. La vacunación ha sido utilizada en diversos países como una medida para el control de la DVB, de esta manera podemos encontrar en el mercado nacional e internacional vacunas activas modificadas e inactivadas; por lo general, comercializadas en presentación polivalente y múltiple. (Van Oirschot, 2001). Adicionalmente, existen otros inmunógenos como vacunas de ADN (Nobiron *et al.*, 2003), de subunidades (Bruschke *et al.*, 1997) y recombinantes (Loy *et al.*, 2013) que aunque aún están en etapa de experimentación y evaluación también pueden ser utilizados en programas de control de la DVB.

Las vacunas contra el vDVB están disponibles en muchos países, sin embargo, su uso puede diferir entre países. Algunos de éstos solo permiten el uso de algún tipo de inmunógeno; por ejemplo, en Reino Unido, Eslovenia, Irlanda y Holanda solo autorizan el uso de vacunas inactivadas. Por otro lado, los países escandinavos y Austria prohíben el uso de vacunas contra el vDVB (Alenius *et al.*, 1997).

En México, las vacunas disponibles contienen al vDVB activo o inactivo, por lo general se combinan con otros antígenos virales como HVB-1, PI-3, vSRB; así

como algunos antígenos bacterianos (*Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. Pomona*, *Haemophilus somnus*, y *Pasteurella (Manhemia) haemolytica A*). En el siguiente recuadro se enlistan algunos de los productos vacunales comerciales disponibles en México (Cuadro 1.2).

Vacunas para el control del DVB en México			
Nombre	Laboratorio	Componentes	Tipo de vacuna
ARSENAL® 4.1	NOVARTIS	Virus de Diarrea Viral tipo 1 y 2, virus de IBR y PI3	Vacuna activa modificada
BAYOVAC BRSV VAC 4	BAYER	Virus de Diarrea Viral Bovina tipos 1 y 2, IBR, Parainfluenza tipo 3 y Virus Sincitial Respiratorio Bovino.	Vacuna activa modificada
BAYOVAC HORIZON 9MR CON PROLONG	BAYER	Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR). Diarrea Viral Bovina (DVB). Parainfluenza 3 (PI3). Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV). Vacuna combinada con bacterina de: bacterias inactivadas de <i>Leptospira canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. hardjo</i> , <i>L. pomona</i> y <i>L. icterohaemorrhagiae</i> .	-IBR (virus inactivado) -DVB (virus inactivado) -PI-3 (virus activo modificado) -VSRB (virus activo modificado)
BOVIMUNE MASTER L5®	Lapisa	IBR, DVB, BRSV, PI3	Virus activos modificados
BOVIMUNE PROTECTOR® L5	Lapisa	IBR, DVB, BRSV, PI3	Virus activos modificados
BOVIRAL-3®	TORNEL	IBR cepa Colorado, DVB cepa citopática NADL (Tipo 1), cepa no citopática New York (tipo 2), PI3.	Virus inactivados
BOVI-SHIELD® GOLD FP 5	Pfizer	IBR, DVB (tipos 1 y 2), PI3 y VRSB	Virus activos modificados
BOVI-SHIELD GOLD® FP 5 L5TM	Pfizer	IBR, DVB, BRSV, PI3. Vacuna combina con bacterina de <i>Leptospira canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. hardjo</i> , <i>L. icterohaemorrhagiae</i> , <i>L. Pomona</i> .	Virus activos modificados
BOVISHIELD+ONE SHOT SQ	Pfizer	IBR, DVB, PI3, BRSV. Vacuna combinada con leucotoxide de <i>Pasteurella (Manhemia) haemolytica A1</i> .	Virus activos modificados
CATTLEMASTER® GOLD FP 5	Pfizer	IBR, PI3 y DVB (tipos 1 y 2)	- IBR y PI-3 virus activos modificados -DVB 1 y 2 virus inactivados
ELITE® 9 Hs	Boehringer-Ingelheim	IBR, DVB, PI3 y VRSB. Vacuna combinada con bacterina: contra <i>Histophilus somni (Haemophilus somnus)</i> y 5 leptospiros: <i>Leptospira canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. icterohaemorrhagiae</i> , <i>L. pomona</i> , <i>L. hardjo</i> .	Virus inactivado
EXPRESS® FP 5 Hs	Boehringer-Ingelheim	IBR, DVB (tipo 1 y 2), PI3 y VRSB. Vacuna combinada con bacterina contra <i>Histophilus somni (Haemophilus somnus)</i> .	Virus activos modificados
EXPRESS® FP 10 Hs	Boehringer-Ingelheim	IBR, DVB, PI3 y VRSB. Vacuna combinada con bacterina: de <i>Histophilus somni (Haemophilus somnus) (Hs)</i> , <i>Leptospira canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. Hardjo</i> , <i>L. icterohaemorrhagiae</i> y <i>L. pomona</i> .	Virus activos modificados
PYRAMID® 5 MLV	Boehringer-Ingelheim	IBR, DVB (tipo 1 y 2), PI3 y VRSB.	Virus activos modificados
TRIANGLE® 9+ TIPO II BVD	Boehringer-Ingelheim	IBR cepa McKercher, DVB tipo 1a cepa Singer, tipo 2a cepa 5912, PI3 cepa SF4, VRSB cepa Diamond. Vacuna combinada con Bacterina inactivada para la prevención de enfermedades causadas por: <i>Leptospira canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. hardjo</i> , <i>L. icterohaemorrhagiae</i> y <i>L. pomona</i> .	Virus inactivado
JENCINE 4®	INTERVET	IBR, DVB (tipo 1), PI3 y VRSB.	Virus activos modificados
TITANIUM® 5	VIRBAC	IBR cepa RT-22 DK. DVB-1 cepa Oregon C24V. DVB-2 cepa 296. Parainfluenza 3 cepa Abbott. VRSB cepa Lehmkuhl 375.	Virus activos modificados
VIRA SHIELD® 6+L5	NOVARTIS	DVB-1 no citopático y DVB-2 citopático y no citopático, IBR, PI3, VRSB. Vacuna- combinada con <i>Leptospira canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. hardjo</i> , <i>L. icterohaemorrhagiae</i> y <i>L. pomona</i> .	Virus inactivados
VIRA SHIELD 6 + SOMNUS	NOVARTIS	DVB-1 no citopático y DVB-2 citopático y no citopático, IBR, PI3, VRSB. Vacuna combinada con bacterina inactivada de <i>Haemophilus somnus (Histophilus somni)</i> .	Virus inactivados

Cuadro 1.2 Vacunas comerciales disponibles en México

La vacunación puede presentar también algunas desventajas, por lo que antes de implementarla como una medida adicional de bioseguridad en un programa de control-erradicación, es necesario analizar cuidadosamente los problemas que se puede desencadenar. Estos problemas incluyen el fracaso a la vacunación, así como cuestiones relacionadas a la eficacia y seguridad de las vacunas (Quaife, 1996).

Algunos de los problemas que presenta la vacunación son:

- *Variación Antigénica.* El vDVB muestra una gran variabilidad antigénica, esto puede interferir con la eficacia de la vacuna; es decir, la respuesta inmunológica es más eficaz contra cepas vacunales homólogas y menor contra cepas de campo con diferente composición antigénica. Como consecuencia mientras más homóloga sea la respuesta inmune, mayor es el grado de reacción cruzada y por lo tanto protección. Debido a lo anterior es importante mantener un estudio de vigilancia acerca del tipo de cepas que circulan en un hato (Lindberg *et al.*, 2006).
- *Uso inadecuado de vacunas activas.* Este tipo de vacunas induce una respuesta, por lo general, satisfactoria; sin embargo, debe tomarse en cuenta que la transmisión *in útero* es un riesgo que se corre al aplicar vacunas activas en ganado gestante (Lindberg *et al.*, 2006). Además, en animales PI el uso de cepas vacunales CP puede desencadenar el desarrollo de la EM por medio de la recombinación genética entre el virus persistente y la cepa vacunal (Ridpath y Bolin, 1995b), por lo que en animales PI se sugiere evitar el uso de vacunas activas (Ridpath, 2013).
- *Respuesta inmunológica contra el antígeno vacunal.* La intensidad de la respuesta tanto humoral como celular, así como su duración son cuestiones a considerarse; ya que en el campo la duración y el alcance que tienen las reacciones cruzadas contra cepas heterólogas no es claro, es por esto que

se ha reportado que aún en animales vacunados se puede desarrollar la enfermedad (Graham *et al.*, 2004; Larson *et al.*, 2004).

- *Remoción de animales PI.* Algunos programas de control no incluyen la remoción de animales PI del hato, por el contrario estos animales se han considerado como un medio económico de “vacunación” para los hatos, adicionalmente se cree que la mayoría de estos animales morirán en un periodo corto después de su nacimiento; sin embargo, esto no ha sido demostrado. Existen trabajos en donde se ha demostrado que la implementación de programas de vacunación en donde no se remueven los PI no tienen éxito al querer reducir la incidencia de la DVB, ya que solo es necesario un animal susceptible para generar un animal PI y favorecer la persistencia del virus en el hato (Lindberg y Houe, 2005; Lindberg *et al.*, 2006). Es importante mencionar que la remoción de los animales PI no es la única medida que se debe tomar para mantener a una población ganadera libre del vDVB, debe estar acompañada de prácticas de bioseguridad enfocadas a la reintroducción de animales PI o la introducción de bovinos gestantes con fetos PI (Lindberg y Houe, 2005).
- *Fracaso en la implementación de estrategias de control.* Para tener un programa de control exitoso de la DVB en donde se utiliza la vacunación, es necesario el compromiso con estrictas prácticas de bioseguridad y apearse a estrategias de vacunación; desde este punto de vista la biocontención es importante para mantener animales susceptibles, como ganado gestante y machos, libres de una exposición al vDVB (Smith y Grotelueschen, 2004).
- *Diagnóstico erróneo.* El uso de vacunas puede hacer confusos los resultados obtenidos por medio de técnicas serológicas. En la actualidad, la alternativa para realizar un estudio de vigilancia por medio de técnicas

serológicas es el uso de animales centinelas, es decir, mantener en el hato un grupo de animales sin vacunar (Linderbeg *et al.*, 2006).

- *Uso de vacunas virales activas contaminadas con el vDVB.* El vDVB es un contaminante común del suero fetal bovino (SFB), debido a la capacidad que tiene el virus de propagación trasplacentaria (Moennig y Leiss, 1995). Por lo general el SFB que se distribuye comercialmente, se obtiene a partir de una mezcla de sueros obtenidos de entre 3500-4000 fetos, por lo tanto diferentes cepas de vDVB pueden encontrarse contaminando el suero y a pesar de que los SFB comerciales se someten a técnicas de inactivación el vDVB resulta ser la mayor fuente contaminación en vacunas de uso veterinario y para humanos (Pastoret, 2010). Gómez *et al.*, 2013, demostraron la presencia de material genético del vDVB en vacunas comerciales, SFBs y cultivo celulares. Debido a esto las vacunas activas tienen el potencial de incrementar la transmisión del vDVB (Linderbeg y Houe, 2005) y diseminarlo al utilizarlas en diferentes hatos y en diversas regiones (Barkema *et al.*, 2001); aunado a esto, al aplicar la vacuna por la vía de muscular, el virus contaminante evade las barreras naturales que previenen la infección, incrementando también el riesgo de transmisión (Antonis *et al.*, 2004). La contaminación de vacunas ha sido reportada por algunos investigadores, incluso existen casos en donde se ha comprobado que el uso de vacunas contaminadas provocó brotes de DVB (Barkema *et al.*, 2001; Falcone *et al.*, 2003a).

2. Justificación

La diarrea viral bovina es una enfermedad con diversas manifestaciones clínicas que incluyen variantes reproductivas, digestivas y respiratorias; causando pérdidas económicas a la industria ganadera.

Diversos estudios publicados describen los genotipos y biotipos del virus que circulan en diversos países; sin embargo, en México la información disponible es limitada ya que no describe los tipos de vDVB predominante en ganado bovino de nuestro país.

3. Hipótesis

Los genotipos vDVB-1, vDVB-2 y vDVB-3 se encuentran circulando en poblaciones ganaderas de diversas regiones de México.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Genotipificar las muestras positivas al vDVB por RT-PCR obtenidas a partir de suero de bovinos y capas flogísticas para determinar los patrones filogenéticos de la región 5' no traducible (5'UTR) del vDVB utilizando herramientas bioinformáticas, con la finalidad de describir la prevalencia de genotipos del virus que circulan en diversas zonas de México.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Realizar virus-neutralización con las muestras de suero para la detección de anticuerpos contra el vDVB, utilizando los tres genotipos del vDVB.

4.2.2 Detectar la presencia del genoma del virus de diarrea viral bovina en muestras de suero y capa flogística provenientes de bovinos.

4.2.3 Obtener las secuencias de la región 5'UTR de cada una de las muestras positivas al vDVB.

4.2.4 Determinar los genotipos del vDVB circulantes en México y su relación con otros genotipos previamente reportados en diferentes países.

5. Material y Métodos

5.1 Cepas de referencia

Se utilizaron las de cepas del vDVB Singer, 296c y HoBi como testigos positivos tanto para las RT-PCR como para las pruebas de neutralización viral.

Para replicar las cepas de referencia Singer y 296c se infectaron monoestratos de la línea celular MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) sin medio de crecimiento contenidas en botellas de 75 cm² con un 80% de confluencia. Una vez inoculadas las botellas se incubaron a 37°C en agitación por una hora; después de transcurrido el tiempo de incubación se decantó el inóculo y se adicionó 20 ml de medio fresco *Minimum Essential Medium Eagle*¹ con 7% de L-glutamina², 10% de antibiótico³ Anti-Anti y 10% de SFB⁴ libre de vDVB. Para la cepa de referencia HoBi, se utilizaron 3 botellas de 25 cm² con una confluencia del 60% y el medio de crecimiento suplementado con 7% de SFB.

Posterior a esto, las botellas fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ por 72 h, momento en el que se observó efecto citopático. Después se realizó lisis celular por congelación a -80°C y posterior descongelación. Una vez realizado lo anterior el cultivo fue centrifugado a 1200 rpm por 10 min para retirar detritus celulares. Se cosechó el virus contenido en el sobrenadante para hacer alícuotas de 1.5 ml del mismo y se conservaron a -80°C hasta su uso.

5.1.1 Titulación de cepas virales de referencia

El título de las cepas virales Singer, 296c y HoBi se determinó en cultivo de células MDBK. Las células se desprendieron de las botellas del cultivo celular por medio del uso de tripsina y posteriormente se cultivaron en placas de 96 pozos con aproximadamente 20 000 células contenidas en 50 µl de MEM suplementado por cada pozo.

¹ MEM Sigma-Aldrich M4655

² Gibco Life technologies 25030-081

³ Anti-Anti Sigma-Aldrich A-5955

⁴ *The cell culture company* A11-265

Brevemente, se realizaron 8 alícuotas de 900 µl de MEM suplementado. Se hicieron diluciones decuples seriadas al adicionar a la primer alícuota 100 µl de la cepa viral a titular y se homogeneizó con el uso de pipeta automática. Posteriormente, de dicha suspensión viral se tomaron 100 µl y se transfirieron a la segunda alícuota, después se repitió este paso hasta llegar a una dilución final de 10^{-8} . En la fila A de la placa se llenaron los primeros 5 pozos con 100 µl de la dilución 10^{-1} ; en la fila B se llenaron 5 pozos con 100 µl de la dilución 10^{-2} . A partir de la fila C hasta la fila H se repitieron los mismos pasos con la correspondiente dilución.

Para cada cepa este ensayo se realizó por triplicado; las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ u se incubaron por 5 días.

El título de cada cepa viral se determinó utilizando la fórmula de Reed-Muench (Reed y Muench, 1938):

$$\text{Título} = \left[\frac{\%>50\% - 50}{\%>50\% - \%<50\%} \times \text{Log del factor de dilución} \right] + \text{Log de la dilución } \%>50\%$$

5.2 Neutralización viral

Para realizar la prueba de neutralización viral (NV) se utilizó la línea celular MDBK y las muestras de suero. Las muestras de cada rancho se dividieron en un grupo de animales mayores de una año, y animales menores de un año; cada uno de estos se subdividieron en grupos de 4, 5 o 6 sueros que posteriormente fueron mezclados (*pool*). Cada grupo de sueros se inactivaron en baño María a 56°C durante 1h.

Cada *pool* de sueros se diluyó con MEM de 1:2 a 1:256 en placas de 96 pozos; utilizando 3 pozos por cada grupo (Fila A, columnas 1-3), y sus respectivas diluciones (Fila A-H). Posteriormente, se adicionaron las cepas utilizadas como testigo positivos (Singer, 296c, y HoBi) manejando una MOI de 0.5 para cada

cepa. Las placas fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ por una hora. Una vez transcurrido este tiempo se agregaron células MDBK en suspensión en 100 µl de MEM. Finalmente, las placas se incubaron por 4 días para realizar la lectura final.

Adicionalmente se repitieron las neutralizaciones virales con los *pools* de muestras que contenían muestras positivas por RT-PCR; en este caso sustituyendo el volumen de la o las muestras positivas por suero negativo a la presencia de anticuerpos del vDVB. La prueba de neutralización viral se realizó de la misma manera previamente descrita.

Para determinar el título de anticuerpos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Log}_2 (\text{end-point dilution}) = \left(x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{n_i}{n_i} \right)$$

x_0 = log₂ de la dilución más baja en donde todos los pozos son positivos

d = log₂ de la dilución

n_i : número de repeticiones (3)

r_i : número de pozos positivos

5.3 Muestras de trabajo (suero)

Se procesaron muestras de suero pertenecientes a ganado bovino de las diversas regiones de México (Cuadro 5.1 y Anexo 1).

Región de origen	Número de muestras analizadas
Napateco, Hidalgo	56
Acayucan, Veracruz	42
Victoria, Tamaulipas	41
Aldama Cascada, Tamaulipas	12
Puente de Ixtla, Morelos	63
San Juan del Río, Querétaro	69
Santa Gertrudis Saucillo, Chihuahua	134

5.1. Número de muestras de suero procesadas por región.

5.4 Muestras de trabajo (capa flogística)

De la misma manera que los sueros, también se procesaron muestras de capa flogística pertenecientes a ganado bovino de las mismas regiones (Cuadro 5.2 y Anexo 2).

Región de origen	Número de muestras analizadas
Napateco, Hidalgo	55
Acayucan, Veracruz	47
Puente de Ixtla, Morelos	69
San Juan del Río, Querétaro	64
Santa Gertrudis Saucillo, Chihuahua	30

5.2 Número de muestras de capa flogística procesadas por región.

5.4.1 Toma de muestras sanguíneas

A cada uno de los animales se le tomaron dos muestras de sangre, utilizando tubos Vacutainer® de 7 ml sin anticoagulante y con EDTA. Las muestras fueron tomadas de la vena coccígea. Una vez obtenidas las muestras se transportaron a 4°C en hieleras, hasta el laboratorio de Vacunología y Constatación para ser procesadas.

Para la obtención de suero las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min, posteriormente con pipeta automática se separó el suero del coágulo y se fraccionó en alícuotas de 1.5 ml aproximadamente; para después almacenarlas a -80°C hasta su uso.

Para la separación de plasma y capa flogística se utilizó Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para cada muestra, en tubos estériles de 15 ml se adicionó 3.5 ml de Histopaque®-1077, posteriormente de manera cuidadosa se sobrepuso 6.5 ml de la sangre completa y se centrifugó a 700 g por 30 min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación se pueden visualizar la formación de capas; la capa de interés es la opaca, la cual contiene linfocitos. Con mucho cuidado, con una pipeta automática se tomó la capa de linfocitos y se transfirió a un tubo estéril de 2 ml y se centrifugó

a 200 g por 10 min, desechando el sobrenadante. La capa flogística se lavó 1 vez con PBS estéril, se desechó nuevamente el sobrenadante y después se reconstituyó la capa flogística con 500 µl de PBS y se mantuvo a -80°C hasta su uso.

5.4.2 Extracción de ARN total

Se realizó la extracción de ARN total a partir de 140 µl de cada una de las muestras de suero, capa flogística y las cepas de referencia utilizando la estación robótica Qicube⁵; para realizar la purificación de ARN automatizada por columna (QIAmp viral RNA minikit; Qiagen), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La elución del ARN se realizó en un volumen de 50 µl y fue almacenado a -80°C hasta su uso.

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

Las muestras de suero, así como las cepas de referencia se sometieron a RT-PCR para amplificar un fragmento de la región 5'UTR utilizando los siguientes iniciadores:

Juegos de Iniciadores utilizados en este estudio				
Iniciador	Sentido	Secuencia	Tamaño del producto (pb)	Autor
VIL 324/326	Forward	ATGCCCATAGTAGGACTAGCA	288	Vilcek (<i>et al.</i> , 1994)
	Reverse	TCAACTCCATGTGCCATGTAC		
HCV 90/368	Forward	CCATGTGCCATGTACAG	278	(Ridpath <i>et al.</i> , 1994)
	Reverse	CATGCCCATAGTAGGAC		
5UTR/START Mahony	Forward	CTAGCCATGCCCTTAGTAGGACTA	292	(Mahony <i>et al.</i> , 2005)
	Reverse	CAACTCCATGTGCCATGTACAGCA		
HoBi N2/R5	Forward	TCGACGCATCAAGGAATGCCT	150	(Bauermann <i>et al.</i> , 2014)
	Reverse	TAGCAGGTCTCTGCAACACCCTAT		

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

⁵ Qiagen®, Hilden, Germany

Para la reacción de RT-PCR utilizando los iniciadores VIL 324/326, HCV 90/368 y 5UTR/START se utilizaron los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer Mg ⁺⁺	10X	1X
dNTP's	10mM	200µM
M-MLV (Invitrogen)	200U/µl	50U
Iniciador sentido	20µM	0.2 µM
Iniciador antisentido	20µM	0.2 µM
Taq polimerasa (Roche)	5U/µl	2.5U/reacción
Inhibidor de RNAsas (Promega)	40U/µl	20U
Agua		c.b.p. 100 µl
Volumen final		100 µl

Cuadro 5.4 Reactivos y concentraciones utilizados para la RT-PCR (VIL 324/326, HCV 90/368 y 5UTR/START).

Para la reacción de RT-PCR utilizando los iniciadores para HoBi se utilizaron los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Reaction mix Buffer Mg ⁺⁺	2X	1X
Super Script III RT/ Platinum Taq Mix (Invitrogen)		
Iniciador sentido	20µM	0.2 µM
Iniciador antisentido	20µM	0.2 µM
Agua		c.b.p. 25 µl
Volumen final		25 µl

Cuadro 5.5 Reactivos y concentraciones utilizados para la RT-PCR (iniciadores HoBi).

Una vez realizada la mezcla de reacción para cada una de las muestras se sometieron a la RT-PCR con las condiciones establecidas en el termociclador. Las cuales se muestran en el siguiente cuadro:

Programas para la RT-PCR			
VIL 324/326	HCV 90/368	5UTR/START	HoBi N2/R5
56°C- 1h	56°C- 1h	56°C- 1h	55°C- 25 min
94°C- 2 min	94°C- 4 min	94°C- 4 min	94°C- 4 min
94°C- 30s	94°C- 10s	94°C- 30s	94°C- 30s
55°C- 30s	50°C- 15s	56.2°C- 30s	55°C- 30s
72°C- 30s	72°C- 45s	72°C- 30s	68°C- 30s
38 ciclos	40 ciclos	35 ciclos	35 ciclos
72°C-7 min	72°C-10 min	72°C-10 min	68°C-10 min

Cuadro 5.6 Condiciones de la RT-PCR. Condiciones de temperatura y ciclos en la RT-PCR establecidas en el termociclador.

5.4 Secuenciación

Los productos de cada una de las muestras positivas al vDVB por medio de RT-PCR, fueron purificados utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction®*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR fueron enviados al Laboratorio de Genómica del *National Center of Animal Disease* USDA en donde fueron secuenciados en ambas direcciones y por duplicado, utilizando el secuenciador automatizado ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, Forest City, CA).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas y procesadas usando el software Codon Code Aligner (versión 6.0.2 CodonCode Corporation); así mismo cada una de las secuencias fue analizada con la herramienta BLAST () para determinar identidad genética.

5.5 Construcción y análisis filogenético

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron alineadas utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), utilizando el software Bioedit (Hall, 1999). El análisis filogenético se llevó a cabo usando el software MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), para el cual se consideraron los siguientes parámetros:

Como modelo de sustitución nucleotídica se utilizó el método Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980) elegido con base en el valor obtenido por el criterio de información bayesiana. Como método de reconstrucción filogenética se utilizó el método de Máxima Verosimilitud (Guindon y Gascuel, 2003), como método de soporte estadístico se utilizaron 500 réplicas de bootstraps (Felsenstein, 1985).

Posteriormente, con la finalidad de conocer la relación filogenética de las cepas encontradas en el estudio con otras previamente publicadas en otros países, se realizó una reconstrucción filogenética con secuencias procedentes del *GenBank*.

6. Resultados

6.1 Títulos de cepas virales

Posterior a los 5 días de inoculación se determinó el título de cada una de las cepas de referencia al observar vacuolización como efecto citopático. El título se presenta en el siguiente cuadro:

Cepa de referencia	Título
Singer	1.5×10^7 TCID/100 μ l
296c	3.2×10^8 TCID/100 μ l
HoBi	1.5×10^7 TCID/100 μ l

Cuadro 6.1 Títulos de las cepas virales utilizadas como testigos positivos.

6.2 Neutralización viral

El objetivo de realizar la NV a partir de las muestras de sueros fue detectar la presencia de anticuerpos contra el vDVB tipo 1, 2 y HoBi-like presentes en muestras de sueros de animales menores de un año y mayores a un año. La neutralización viral fue detectada por la inhibición de la infectividad viral, evidenciada por la ausencia de efecto citopático. Tomando en cuenta como muestra cada uno de los *pools* de sueros.

Posteriormente, los sueros fueron sometidos a RT-PCR y las muestras positivas al vDVB fueron removidas del *pool* y reemplazadas por suero bovino libre de anticuerpos, para determinar las variaciones en el título de anticuerpos.

Los resultados de las neutralizaciones virales se muestran por región y edad de los animales en los siguientes cuadros (Cuadro 6.2 al 6.11):

Región: Napateco, Hidalgo								
>1 AÑO								
			NV'S			NV'S SIN (+)		
V	Muestra	Edad	Singer	296c	HoBi	Singer	296c	HoBi
NV	Bellota	4 AÑOS						
NV	Chaparrita 2	4 AÑOS						
NV	Pinta 2	4 AÑOS						
NV	Chilindrina	4 AÑOS	7.16	3.83	5.83			

NV	1813	4 AÑOS						
NV	1821	4 AÑOS						
NV	1818	4 AÑOS						
NV	Chaparrita 1	4 AÑOS						
NV	Coneja	4 AÑOS						
NV	1816	4 AÑOS	11.16	7.5	8.16			
NV	1797	4 AÑOS						
NV	Paloma	4 AÑOS						
NV	Amarilla	4 AÑOS						
NV	1807	4 AÑOS						
NV	Uva	4 AÑOS	5.83	5.83	5.16			
NV	La Café	4 AÑOS						
NV	Chiva	4 AÑOS						
NV	Pinta 1	4 AÑOS						
NV	La Negra	4 AÑOS						
NV	Tatiana	4 AÑOS	8.83	8.16	8.5			
NV	Gorda	4 AÑOS						
NV	1816-G	4 AÑOS						
NV	Pancha	4 AÑOS						
NV	14	4 AÑOS						
NV	13	4 AÑOS	10.16	6.83	8.5			
NV	Abigail	4 AÑOS						
NV	Josefina	4 AÑOS						
NV	9	4 AÑOS						
NV	Renga	4 AÑOS						
NV	Gorda 2	4 AÑOS	8.5	5.5	7.16			
NV	Pili	4 AÑOS						
NV	Elefante	4 AÑOS						
NV	Lucero	4 AÑOS						
NV	Rufina	4 AÑOS						
NV	Negra	4 AÑOS	0	0	0			
NV	Canela	4 AÑOS						
NV	Jabonera Jr	4 AÑOS						
NV	10	4 AÑOS						
NV	Mocha	4 AÑOS						
NV	Fabiola	4 AÑOS	6.16	6.5	5.83			
NV	María	4 AÑOS						
NV	Alejandra	4 AÑOS						
NV	Canela 2	4 AÑOS						
NV	Rubí	4 AÑOS						
NV	Jabonera Madre	4 AÑOS	0	0	0			

NV	Blanca	4 AÑOS						
NV	Pancracia	4 AÑOS						
NV	4	4 AÑOS						
NV	11	4 AÑOS						
NV	Colorada	4 AÑOS	8.5	5.5	6.16			
NV	Parda	4 AÑOS						
NV	Renga 2	4 AÑOS						
NV	7	4 AÑOS						
NV	Perla	4 AÑOS						
NV	15	4 AÑOS						
NV	Liliana	4 AÑOS	7.5	5.5	6.83			

Cuadro 6.2 Resultados de la neutralización viral de la región de Napateco, Hidalgo.

Región: Acayucan, Veracruz								
> 1 AÑO								
V	Muestra	Edad	NV'S			NV'S SIN (+)		
			Singer	296c	HoBi	Singer	296c	HoBi
V	Amar. 9472	4 AÑOS						
V	353	6 AÑOS						
V	Félix 2	7 AÑOS						
V	Félix 3	7 AÑOS						
V	A9464	10 AÑOS	5.83	7.83	5.83	5.16	8.5	6.5
V	A9362							
V	A4134	9 AÑOS						
V	L2	2 AÑOS						
V	A9366	7 AÑOS						
V	A9455		8.5	8.16	7.5	8.5	8.5	6.5
V	M604008	9 AÑOS						
V	976	7 AÑOS						
V	A9410	9 AÑOS						
V	A9360	9 AÑOS						
V	A9342	8 AÑOS	7.5	8.5	6.16			
V	A9376							
V	A9495	3 AÑOS						
V	A9347	10 AÑOS						
V	A9473	5 AÑOS						
V	9352	10 AÑOS	8.5	7.16	5.5	6.83	6.83	3.16
V	Félix 4	7 AÑOS						
V	L280	3 AÑOS						
V	9474	8 AÑOS	6.83	8.5	4.83	6.5	5.16	2.83

V	Meta 439490							
V	Lomo 932 metálico	7 AÑOS						
V	Lomo 276	3 AÑOS						
V	719	3 AÑOS						
V	L225	11 AÑOS						
V	A0367	7 AÑOS						
V	9363	7 AÑOS	6.5	5.83	2.83	7.16	6.83	2.5
V	M373458	9 AÑOS						
V	Amari 9471	6 AÑOS						
V	9358	9 AÑOS						
V	369	7 AÑOS						
V	Amaril 9485 Lomo 287	8 AÑOS	8.5	7.16	4.83	8.5	7.83	5.5
V	A9431	3 AÑOS						
V	9346	9 AÑOS						
V	Amarillo 390	9 AÑOS						
V	Amaril 9476	8 AÑOS	5.5	4.83	3.83			
V	L2198	10 AÑOS						
V	Félix 1	7 AÑOS						
V	Ama 6077							
V	759		5.5	8.5	5.83			

Cuadro 6.3 Resultados de la neutralización viral de la región de Acayucan, Veracruz. Animales mayores de un año.

< 1 AÑO								
			NV'S			NV'S SIN (+)		
V	Muestra	Edad	Singer	296c	HoBi	Singer	296c	HoBi
NV	A9453	11M						
NV	A9457	11M						
NV	L442	9M						
NV	L450	11M	0	0	0			

Cuadro 6.4 Resultados de la neutralización viral de la región de Acayucan, Veracruz. Animales menores de un año.

Región: Victoria, Tamaulipas								
> 1 AÑO								
			NV'S			NV'S SIN (+)		
V	Muestra	Edad	Singer	296c	HoBi	Singer	296c	HoBi
V	15	13M						
V	18	13M						
V	19	13M						
V	22	13M	8.5	9.83	6.5			

V	23	14M						
V	25	13M						
V	30	13M						
V	31	13M						
V	34	14M						
V	40	48M	8.16	9.83	6.5			
V	42	48M						
V	43	50M						
V	44	60M						
V	45	60M						
V	48	36M	10.5	9.5	6.5			
V	50	40M						
V	51	50M						
V	52	36M						
V	53	42M	9.5	8.83	8.16			
V	41	50M						
V	3	12M						
V	9	12M						
V	10	12M						
V	14	13M	10.5	8.16	7.83			
V	16	12M						
V	21	12M						
V	26	12M						
V	28	12M						
V	32	12M	9.5	8.16	7.5			

Cuadro 6.5 Resultados de la neutralización viral de la región Victoria Tamaulipas. Animales mayores de un año.

< 1 AÑO								
V	Muestra	Edad	NV'S			NV'S SIN (+)		
			Singer	296c	HoBi	Singer	296c	HoBi
NV	1	3M						
NV	2	3M						
V	4	8M						
V	5	10M						
V	6	10M	9.16	9.16	6.5			
V	7	11M						
V	8	10M						
V	11	11M						
V	12	10M						
V	20	10M	10.5	9.16	7.16			

V	24	11M						
V	27	10M						
V	29	10M						
V	36	10M						
V	37	11M						
V	38	10M	10.5	8.16	6.5	8.5	8.5	6.16

Cuadro 6.6 Resultados de la neutralización viral de la región de Victoria, Tamaulipas. Animales menores de un año.

Región: Puente Ixtla, Morelos								
> 1 AÑO								
V	Muestra	Edad	NV'S			NV'S SIN (+)		
			Singer	296c	HoBi	Singer	296c	HoBi
V	2036	5 AÑOS						
V	1968	5 AÑOS						
V	2018	5 AÑOS						
V	1955	5 AÑOS						
V	1967	5 AÑOS	11.83	9.83	8.5			
V	1959	5 AÑOS						
V	2014	5 AÑOS						
V	1984	5 AÑOS						
V	2208	5 AÑOS						
V	2035	5 AÑOS	9.83	5.8	7.16			
V	2003	5 AÑOS						
V	1954	5 AÑOS						
V	2012	5 AÑOS						
V	1994	5 AÑOS						
V	1962	5 AÑOS	7.5	6.16	6.16			
V	2008	5 AÑOS						
V	s/n	5 AÑOS						
V	2214	5 AÑOS						
V	2032	5 AÑOS						
V	1969	5 AÑOS	7.83	6.83	5.16			
V	2002	5 AÑOS						
V	1979	5 AÑOS						
V	2031	5 AÑOS						
V	1960	5 AÑOS						
V	1970	5 AÑOS	8.5	6.16	6.5			
V	1987	5 AÑOS						
V	2004	5 AÑOS						
V	1983	5 AÑOS						
V	2011	5 AÑOS	8.5	5.83	4.83			

V	1998	5 AÑOS						
V	1997	5 AÑOS						
V	2005	5 AÑOS						
V	1958	5 AÑOS						
V	1975	5 AÑOS						
V	1985	5 AÑOS	7.83	5.83	4.16			
V	2215	5 AÑOS						
V	1992	5 AÑOS						
V	1989	5 AÑOS						
V	2037	5 AÑOS						
V	1973	5 AÑOS	8.83	6.83	6.83			
V	2023	5 AÑOS						
V	1982	5 AÑOS						
V	2016	5 AÑOS						
V	2204	5 AÑOS						
V	1956	5 AÑOS	9.16	7.83	6.5			
V	1965	5 AÑOS						
V	2009	5 AÑOS						
V	1972	5 AÑOS						
V	2199	5 AÑOS						
V	2024	5 AÑOS	6.83	6.83	4.83	6.83	5.5	5.16
V	1964	5 AÑOS						
V	2001	5 AÑOS						
V	1990	5 AÑOS						
V	1996	5 AÑOS						
V	2200	5 AÑOS	10.16	8.16	7.83	10.83	8.16	7.16
V	2025	5 AÑOS						
V	1991	5 AÑOS						
V	2013	5 AÑOS						
V	2027	5 AÑOS						
V	1957	5 AÑOS	8.5	7.83	7.5	7.5	7.16	6.16
V	1974	5 AÑOS						
V	1988	5 AÑOS						
V	1978	5 AÑOS						
V	2212	5 AÑOS						
V	2203	5 AÑOS	8.5	8.5	6.83	8.5	7.83	5.5
V	2019	5 AÑOS						
V	2010	5 AÑOS						
V	1976	5 AÑOS						
V	2201	5 AÑOS						
V	2207	5 AÑOS	7.83	6.83	5.83			

V	2000	5 AÑOS						
V	2007	5 AÑOS						
V	1953	5 AÑOS						
V	1986	5 AÑOS						
V	1993	5 AÑOS	8.5	8.16	8.5	3.83	1.83	0

Cuadro 6.7 Resultados de la neutralización viral de la región de Puente Ixtla, Morelos. Animales mayores de una año.

Región: San Juan del Río, Querétaro								
> 1 AÑO								
V	Muestra	Edad	NV'S			NV'S SIN (+)		
			Singer	296c	HoBi	Singer	296c	HoBi
V	149	4 AÑOS						
V	128							
V	216	3 AÑOS						
V	185	3 AÑOS						
V	270	2 AÑOS	8.83	9.83	7.83			
V	281	1 AÑO						
V	291	1 AÑO						
V	313	1 AÑO						
V	278	2 AÑOS						
V	284	1 AÑO	6.5	7.5	4.83			
V	305	1 AÑO						
V	289	1 AÑO						
V	206	2 AÑO						
V	302	1 AÑO						
V	293	1 AÑO	6.5	5.5	4.16	2.83	4.16	2.16
V	283	1 AÑO						
V	290	1 AÑO						
V	227	2 AÑOS						
V	209	2 AÑOS						
V	224	2 AÑOS						
V	275	2 AÑOS	8.16	8.16	6.16	8.5	8.5	6.5
V	266	2 AÑOS						
V	268	2 AÑOS						
V	244	2 AÑOS						
V	261	2 AÑOS						
V	258	2 AÑOS						
V	492		7.83	9.83	6.83			
NV	158	4 AÑOS						
NV	99	5 AÑOS						
NV	112	5 AÑOS	5.83	6.5	4.83			

NV	104	5 AÑOS						
NV	147	4 AÑOS						
NV	176	3 AÑOS						
NV	81	7 AÑOS						
NV	135	4 AÑOS						
NV	189	2 AÑOS						
NV	417	1 AÑO	7.83	8.5	6.83	7.83	7.83	5.83
NV	418	1 AÑO						
NV	70	5 AÑOS						
NV	421	1 AÑO						
NV	174	4 AÑOS						
NV	121	4 AÑOS	8.83	7.83	6.5			
NV	230	7 AÑOS						
NV	422	1 AÑO						
NV	419	1 AÑO						
NV	416	1 AÑO						
NV	238	2 AÑOS	9.16	7.16	6.16			
NV	187	3 AÑOS						
NV	92	5 AÑOS						
NV	73	5 AÑOS						
NV	251	4 AÑOS						
NV	137	4 AÑOS	7.16	7.83	4.5	6.83	7.16	4.16
NV	502	2 AÑOS						
NV	222	2 AÑOS						
NV	177	2 AÑOS						
NV	173	1AÑOS	8.5	8.5	4.83	3.5	4.83	2.5
NV	500	2 AÑOS						
NV	171	4 AÑOS						
NV	4	7 AÑOS						
NV	133	4 AÑOS	10.5	9.16	8.5			

Cuadro 6.8 Resultados de la neutralización viral de la región de San Juan del Río, Querétaro. Animales mayores de un año.

< 1 AÑO

V	Muestra	Edad	NV'S			NV'S SIN (+)		
			Singer	296c	HoBi	Singer	296c	HoBi
NV	131	8 M						
NV	510	RN						
NV	508	RN						
NV	509	RN	8.16	9.16	6.83			

Cuadro 6.9 Resultados de la neutralización viral de la región de San Juan del Río, Querétaro. Animales menores de un año.

Región: Santa Gertrudis, Saucillo Chihuahua								
< 1 AÑO								
V	Muestra	Edad	NV'S			NV'S SIN (+)		
			Singer	296c	HoBi	Singer	296c	HoBi
V	2497	8M	0	2.16	0			
V	6422	8M						
V	663	8M						
V	1705	8M						
V	8945	8M						
V	685	8M	0	1.16	0	0	0	0
V	2498	8M						
V	687	8M						
V	2472	8M						
V	611	8M						
V	2461	8M	0	1.83	0			
V	6548	8M						
V	6487	8M						
V	293	8M						
V	673	8M						
V	2121	8M	0	3.16	0	0	0	0
V	665	8M						
V	604	8M						
V	634	8M						
V	6427	8M						
V	313	8M	0	1.16	0			
V	2466	8M						
V	627	8M						
V	681	8M						
V	635	8M						
V	2116	8M	0	1.83	0			
V	6544	8M						
V	K-7	8M						
V	K-10	8M						
V	K-4	8M						
V	K-8	8M	0	0.83	0			
V	6357	8M						
V	K-3	8M						
V	K-6	8M						
V	K-2	8M						
V	17	8M	0	0.83	0	0	0	0
V	K-9	8M						

V	K-1	8M						
V	K-10	8M						
V	K-5	8M						
V	649	8M						
V	2475	8M						
V	607	8M						
V	6257	8M	0	1.16	0	0	0	0
V	6169	8M						
V	8	8M						
V	S/N 1	8M						
V	6201	8M						
V	1658	8M	0/3	2.16	0	0	0	0
V	5736	8M						
V	6166	8M						
V	1219	8M						
V	6442	8M						
V	648	8M	1.16	2.16	0			
V	1175	8M						
V	6439	8M						
V	1329	8M						
V	1660	8M						
V	6108	8M	0	0.83	0	0	0	0
V	6459	8M						
V	85	8M						
V	6274	8M						
V	661	8M						
V	268	8M	0	1.83	0			
V	5756	8M						
V	606	8M						
V	257	8M						
V	S/N 2	8M						
V	435	8M	0	2.16	0	0	0	0
V	6255	8M						
V	1795	8M						
V	S/N 3	8M						
V	1161	8M	0	1.16	0			
V	6366	8M						
V	1671	8M						
V	6315	8M						
V	1279	8M						
V	265	8M	0	0.83	0			

V	2463	8M						
V	2459	8M						
V	6396	8M						
V	2495	8M						
V	2106	8M	1.83	1.16	0			
V	670	8M						
V	S/N 5	8M						
V	6314	8M						
V	S/N 6	8M						
V	1178	8M	0	1.83	0	0	0	0
V	1196	8M						
V	6401	8M						
V	404	8M						
V	1657	8M						
V	2451	8M	0	1.83	0	0	0	0
V	260	8M						
V	633	8M						
V	12	8M						
V	15	8M						
V	644	8M	0	0	0	0	0	0
V	6173	8M						
V	6223	8M						
V	5410	8M						
V	2561	8M						
V	1164	8M	0	1.83	0	0	0	0
V	636	8M						
V	648	8M						
V	2451	8M						
V	2181	8M						
V	2473	8M	0	2.5	0	0	0	0
V	1175	8M						
V	1329	8M						
V	Arete 3	8M						
V	216	8M						
V	2	8M	0	3.83	0	0	0	0
V	4	8M						
V	6098	8M						
V	6542	8M						
V	6487	8M						
V	6407	8M	0	1.16	0	0	0	0
V	6201	8M	0	2.5	0	0	0	0

V	6233	8M					
V	5742	8M					
V	8559	8M					
V	8944	8M					

Cuadro 6.10 Resultados de la neutralización viral de la región de Santa Gertrudis, Saucillo Chihuahua. Animales menores de un año.

> 1 AÑO								
V	Sample	Edad	NV'S			NV'S SIN (+)		
			Singer	296c	HoBi	Singer	296c	HoBi
V	J-135	2 AÑOS						
V	B-87	2 AÑOS						
V	K-490	2 AÑOS						
V	B-11	2 AÑOS						
V	B-3	2 AÑOS						
V	J-136	2 AÑOS	9.16	8.5	6.83			
V	C-47	2 AÑOS						
V	I-37	2 AÑOS						
V	D-42	2 AÑOS						
V	B-10	2 AÑOS						
V	M-433	2 AÑOS						
V	G-25	5 AÑOS	8.5	8.5	7.16	7.16	7.5	5.83

Cuadro 6.11 Resultados de la neutralización viral de la región de Santa Gertrudis, Saucillo Chihuahua. Animales mayores de un año.

6.3 Amplificación del fragmento de la región 5'UTR a partir de muestras de suero

Los resultados obtenidos de la RT-PCR utilizando los 4 juegos de iniciadores se muestran resumidos en el siguiente cuadro (Cuadro 6.12):

Región	VIL	HCV	HoBi	Mahony	Total
Hidalgo	0	0	0	0	0
Veracruz	0	0	0	9	9
Tamaulipas	0	0	0	2	1
Querétaro	6	1	0	11	18
Morelos	0	11	0	1	12
Chihuahua	20	39	0	24	83

Cuadro 6.12 Número de muestras positivas al vDVB por RT-PCR a partir de muestras de suero.

Los resultados de cada muestra analizada se encuentran en el Anexo 3.

6.4 Amplificación del fragmento de la región 5'UTR a partir de muestras de capa flogística

Los resultados obtenidos de la RT-PCR utilizando los 4 juegos de iniciadores se muestran en el siguiente cuadro (Cuadro 6.13):

Región	VIL	HCV	HoBi	Mahony	Total
Hidalgo	0	0	0	0	0
Veracruz	0	1	0	4	5
Querétaro	0	0	0	0	0
Morelos	1	0	0	2	3
Chihuahua	0	0	0	0	0

Cuadro 6.13 Número de muestras positivas al vDVB por RT-PCR a partir de muestras de capa flogística.

Los resultados de cada muestra analizada se encuentran en el Anexo 4.

6.5 Secuenciación

Las muestras de suero positivas a la RT-PCR fueron identificadas de las siguiente manera:

Relación de muestras detectadas por los iniciadores VIL, HCV y Mahony				
Identificación	Muestra	VIL	HCV	MAHONY
NG1/NG2/NG11	34-Q	X	X	X
NG10	15-Q			X
NG12	28-V			X
NG13/NG14/NG15	63-C	X	X	X
NG16/NG17/NG36	103-C	X	X	X
NG18/NG31/NG124	53-C	X	X	X
NG19/NG105	12-C		X	X
NG20/NG106	13-C		X	X
NG21/NG108	15-C		X	X
NG22	16-C		X	
NG23/NG109	17-C		X	X
NG24	18-C		X	
NG25	91-C		X	
NG26/NG44	97-C	X	X	
NG27/NG78/NG121	116-C	X	X	X
NG28	32-Q			X
NG29/NG122	51-Q	X		X
NG30/NG123	52-Q	X		X
NG32/NG102	66-M			X
NG33/NG57	34-C		X	X

NG34/NG63/NG37/ NG111	44-C	X	X	X
NG35/NG40	57-C	X		X
NG38/NG112	45-C	X		X
NG39/NG64/NG113	46-C	X	X	X
NG41/NG68/NG116	60-C	X	X	X
NG42/NG69/NG117	61-C	X	X	X
NG43	90-C	X		
NG45/NG81	106-C	X	X	
NG46/NG82	108-C	X	X	
NG47/NG83	109-C	X	X	
NG48/NG85	112-C	X	X	
NG49	47-M		X	
NG50	48-M		X	
NG51	53-M		X	
NG52	54-M		X	
NG53	55-M		X	
NG54	67-M		X	
NG55	68-M		X	
NG56	69-M		X	
NG58	35-C		X	
NG59	39-C		X	
NG60	40-C		X	
NG61	41-C		X	
NG62	43-C		X	
NG65	54-C		X	
NG66/ NG114	58-C		X	X
NG67/NG115	59-C		X	X
NG70	62-C		X	
NG71/NG118	64-C		X	X
NG72	65-C		X	
NG73/NG119	66-C		X	X
NG74	94-C		X	
NG75	113-C	X		
NG76/NG86	114-C	X	X	
NG77	115-C	X		
NG79/NG87	130-C	X	X	
NG80/NG90	133-C	X	X	
NG84	110-C		X	
NG88	131-C		X	
NG89	132-C		X	
NG91	13-Q			X
NG92	1-V			X
NG93	2-V			X
NG94	9-V			X

NG95	16-V			X
NG96	18-V			X
NG97	20-V			X
NG98	24-V			X
NG99	25-V			X
NG100	39-T			X
NG101	9Que			X
NG103	10-C			X
NG104	11-C			X
NG107	14-C			X
NG110	42-C			X
NG120	82-C			X
NG125		X		
NG126		X		

Cuadro 6.14 Relación de muestras de suero positivas y su identificación para secuenciación.

Las muestras de capa flogística positivas a la RT-PCR fueron identificadas de la siguiente manera:

Relación de muestras detectadas por los iniciadores VIL, HCV y Mahony				
Identificación	Muestra	VIL	HCV	MAHONY
NG127	976-V	X		
NG128	9366-V			X
NG129	6077-V			X
NG130	9493-V			X
NG131	M604408-V			X
NG132	2012-M			X
NG133	2001-M			X

Cuadro 6.15 Relación de muestras capa flogística positivas y su identificación para secuenciación.

6.6 Análisis Filogenético de muestras de suero

La construcción del árbol filogenético se realizó a partir de un fragmento de la región 5'UTR utilizando las secuencias de las muestras positivas y secuencias de referencia obtenidas del *GenBank* (Figuras 6.1-6.3). Las secuencias identificadas como NG28, NG30, NG36, NG48, NG54, NG56, NG59, NG62, NG67, NG70, NG75, NG77, NG88, NG91, NG92, NG100, NG101, NG102, NG103, NG104, NG105, NG107, NG108, NG109, NG110, NG112, NG116, NG117, NG118, NG119, NG121 y NG126 mostraron una identidad del 100% con

la secuencia NG20, por lo cual las 32 secuencias son representadas en el árbol con la secuencia NG20.

El árbol filogenético muestra los clados correspondientes al vDVB-1, vDVB-2, HoBi-*like*, vEF, vFPC y virus de Pronghorn. El 91.17% de las secuencias analizadas en este trabajo se agruparon dentro del clado del vDVB-1, el cual a su vez está dividido en 3 clados pertenecientes a los subgrupos vDVB-1a, vDVB-1b y vDVB-1c; siendo este último con el que mostraron identidad el 75% de las secuencias. Mientras que el 2.94% de las muestras se agruparon en el clado del vDVB-2a. Ninguna de las secuencias se agrupó en el clado de los virus HoBi-*like*.

Adicionalmente, el análisis mostró que las secuencias identificadas como NG49, NG52 y NG99 se alojaron dentro del clado correspondiente al del vEF y la secuencia NG12 dentro del clado del virus de Pronghorn.

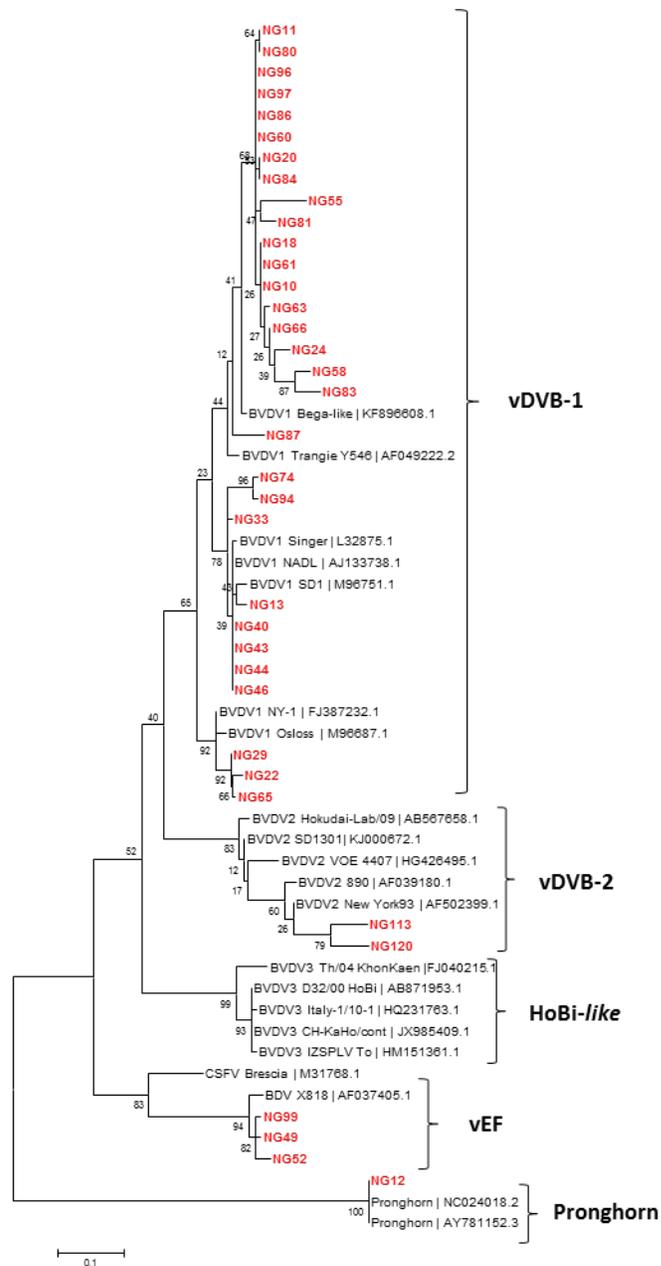


Figura 6.1 Análisis filogenético del vDVB basado en la región 5'UTR. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud utilizando un fragmento de 275 nucleótidos contenido en la región 5'UTR. Se utilizaron las secuencias obtenidas en este trabajo (rojo) y cepas de referencia obtenidas del *GenBank*. El número de acceso de las secuencias de referencias esta indicado a un costado del nombre de la cepa. Los números sobre los nodos representan el valor de bootstrap.

Para poder determinar a que genotipo del vEF pertenecen las muestras identificadas como NG49, NG52 y NG99 se realizó un árbol filogenético utilizando las secuencias de referencia de los 6 genotipos del vEF, además de los demás integrantes que conforman el género *Pestivirus*. Dichas muestras se alojaron dentro del genotipo 1 del vEF.

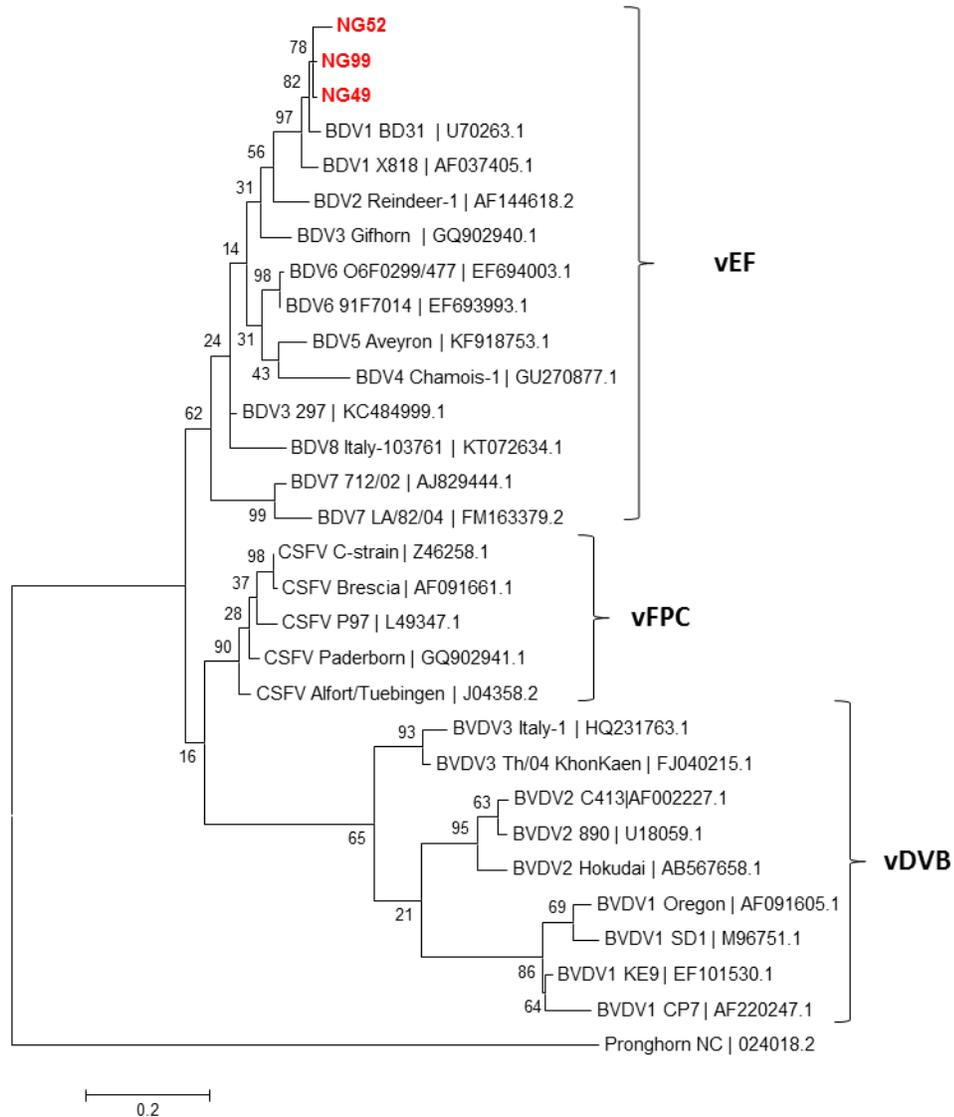


Figura 6.2 Análisis filogenético de *Pestivirus* basado en la región 5'UTR. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud utilizando un fragmento de 275 nucleótidos contenido en la región 5'UTR. Se utilizaron las secuencias obtenidas en este trabajo (rojo) y cepas de referencia obtenidas del *GenBank*. El número de acceso de las secuencias de referencias esta indicado a un costado del nombre de la cepa. Los números sobre los nodos representan el valor de bootstrap.

Así mismo, se realizó la construcción filogenética del árbol únicamente con la muestra NG12, comparándola con las secuencias del virus de Pronghon reportadas hasta la fecha; corroborando que se agrupa en el clado de dicho grupo viral.

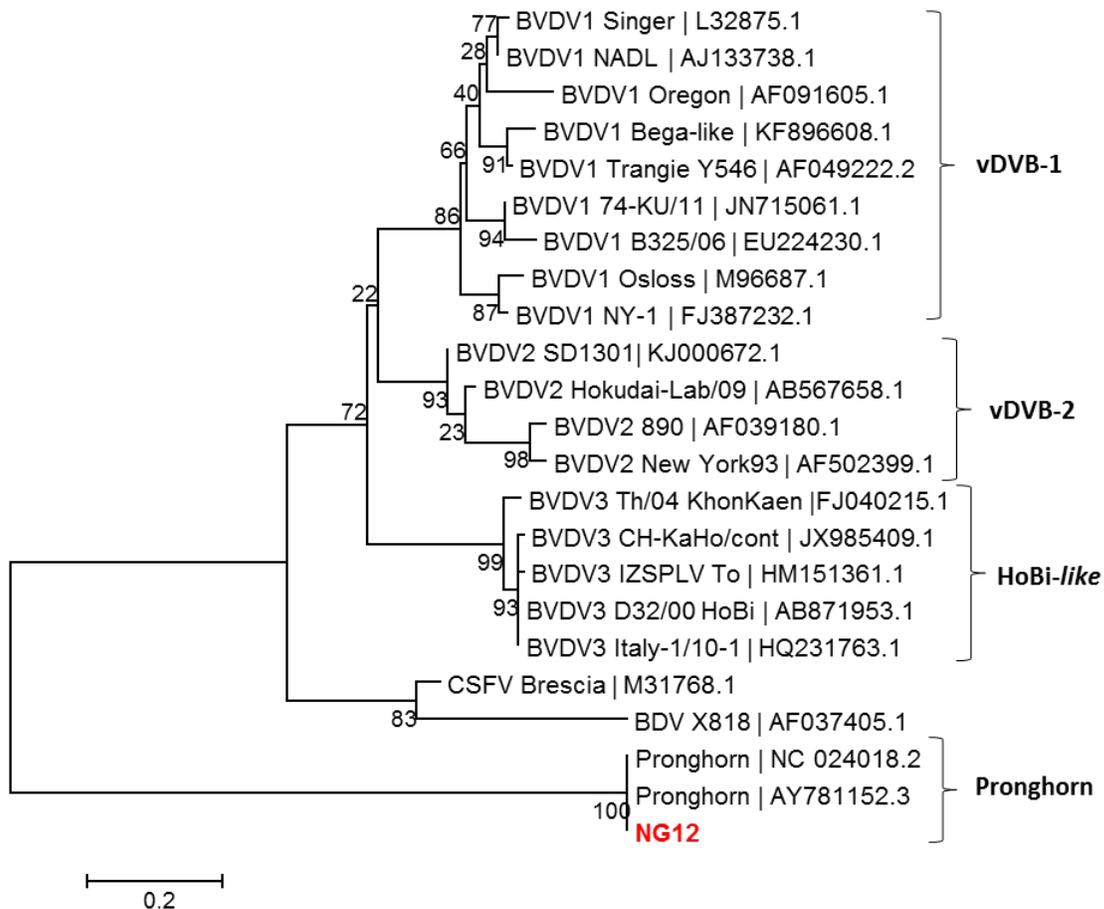


Figura 6.3 Análisis filogenético de *Pestivirus* basado en la región 5'UTR. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud utilizando un fragmento de 275 nucleótidos contenido en la región 5'UTR. Se utilizaron las secuencias obtenidas en este trabajo (rojo) y cepas de referencia obtenidas del *GenBank*. El número de acceso de las secuencias de referencias está indicado a un costado del nombre de la cepa. Los números sobre los nodos representan el valor de bootstrap.

6.7 Análisis Filogenético de muestras de capa flogística

La construcción del árbol filogenético utilizando muestras de capa flogística positivas al vDVB se realizó con solo 3 de las secuencias. Debido a la baja calidad de las demás secuencias. Para éste análisis se utilizaron secuencias de referencia de los virus que conforman el género *Pestivirus*. Las muestras NG127, NG129 y NG133 se observan agrupadas en los clados del vDVB-1a, vDVB-2a y Pronghorn.

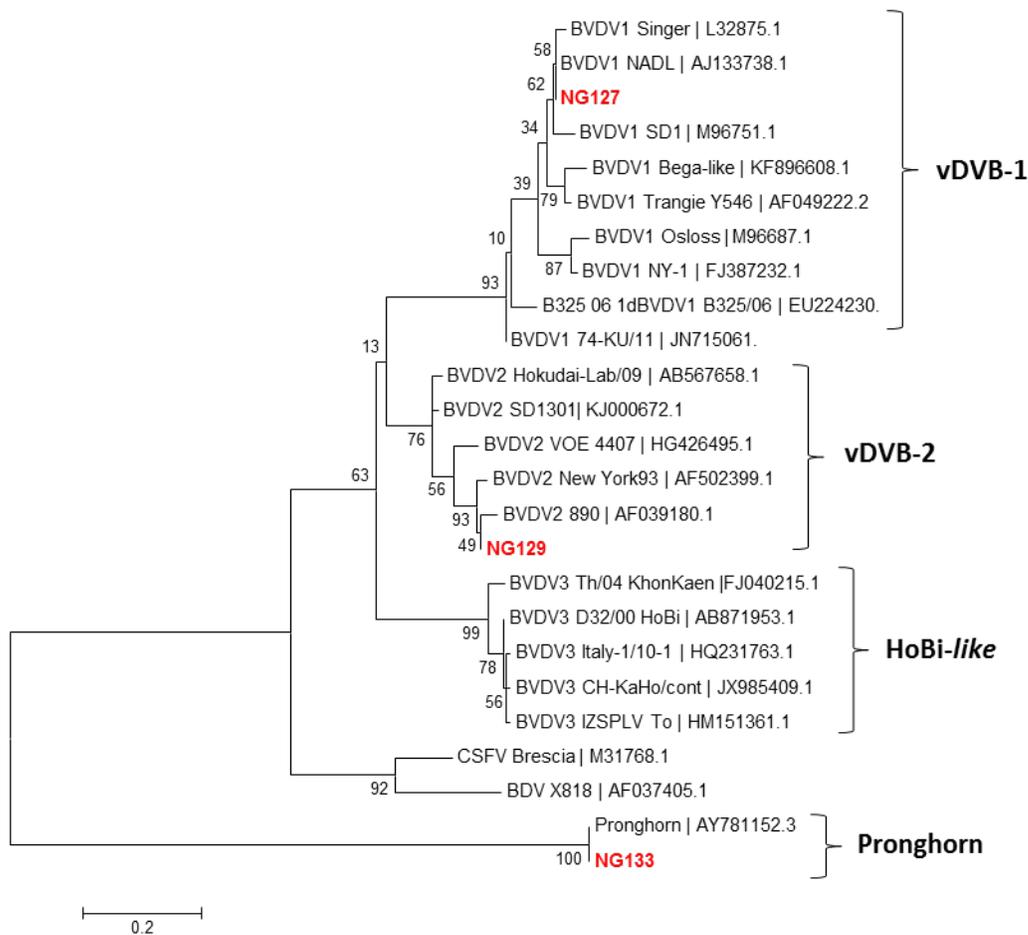


Figura 6.4 Análisis filogenético de *Pestivirus* basado en la región 5'UTR. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud utilizando un fragmento de 275 nucleótidos contenido en la región 5'UTR. Se utilizaron las secuencias obtenidas en este trabajo (rojo) y cepas de referencia obtenidas del *GenBank*. El número de acceso de las secuencias de referencias esta indicado a un costado del nombre de la cepa. Los números sobre los nodos representan el valor de bootstrap.

7. Discusión

Para determinar si las muestras de suero de los animales analizadas contienen anticuerpos contra los 3 genotipos del vDVB se realizaron neutralizaciones virales. Las muestras analizadas fueron divididas en animales menores de un año y mayores de un año; dividirlos de esta manera nos permite conocer el perfil serológico de un animal menor a un año el cual es el reflejo de la exposición al vDVB de los animales en el último año dentro de la unidad de producción, mientras que los animales mayores a un año representan la exposición que se ha acumulado durante la vida de los animales, por lo que nos permite conocer el perfil serológico en un hato a través de los años.

Considerando como muestra cada uno de los *pools* de sueros, la NV permitió identificar que el 67.1% de las muestras tenían anticuerpos contra el vDVB, mientras que el 32.9% carecía de ellos.

Todas las muestras provenientes de la región de Hidalgo fueron negativas por RT-PCR; sin embargo, el título de anticuerpos promedio de estos animales tuvo mayor actividad neutralizante contra la cepa Singer (vDVB-1) en comparación con el vDVB tipo 2 y HoBi-like; sin embargo, dicho título no es indicativo de protección, por lo que estos animales pueden llegar a desarrollar signos de la enfermedad si son expuestos a una nueva infección viral (Bolin y Ridpath, 1995). Es importante mencionar que estos animales nunca han sido vacunados, por lo tanto los anticuerpos identificados son el resultado de la exposición al virus en algún momento de su vida.

En el caso de las muestras de animales de Veracruz, los animales mayores de un año fueron vacunados, mientras que los animales jóvenes, menores a un año, no lo fueron; por lo tanto los resultados de las NV evidencian la presencia de anticuerpos en animales adultos, neutralizando en la mayoría de los casos el vDVB-1 y en su minoría vDVB-2, lo cual sugiere una neutralización cruzada de los anticuerpos. Lo anterior puede ser corroborado ya que los análisis

de secuencias de las muestras positivas provenientes de esta región solo identificaron la presencia del vDVB-1a y 1c. Los animales jóvenes carecieron de anticuerpos neutralizantes detectables, esto puede ser debido a que los anticuerpos obtenidos a través del calostro no tienen una vida mayor a los 6 meses (Coria y McClurkin, 1978b) y dichos animales tienen de 9 a 11 meses de edad, otro motivo por el cual no se detectaron anticuerpos es porque los animales no habían tenido exposición alguna al vDVB ya sea vacunal o de campo. Incluso es de este hato del cual se identificó la presencia de un Pestivirus atípico el cual se menciona más adelante.

Asimismo, en el caso de las muestras de Tampico se mantuvo el mismo escenario que en el caso de Veracruz, animales adultos que tuvieron anticuerpos neutralizantes contra los tipos 1 y 2 del vDVB; solo que en este caso los animales jóvenes fueron vacunados, motivo por el cual tuvieron títulos de anticuerpos similares al de los adultos, dichos títulos han demostrado proteger a los animales de la DVB (Howard *et al.*, 1992).

Las muestras de animales de Morelos, provenían de animales vacunados contra los genotipos 1 y 2 del vDVB. Los títulos obtenidos son considerados de moderados a altos por lo tanto se podría inferir que los animales están protegidos contra la DVB (House y Manley, 1973); no obstante, por medio de RT-PCR fueron detectadas 10 muestras como positivas, las cuales pertenecen al vDVB1c y vEF.

Las muestras provenientes de Querétaro pertenecen a animales que nunca han recibido vacunación contra el vDVB; sin embargo, todos presentan anticuerpos anti-DVB. Lo cual sugiere que dicho ganado ha estado expuesto al virus, incluso en algunos casos se detectó la presencia del genoma del vDVB-1b y 1c. Animales recién nacidos y jóvenes mostraron un título moderado de anticuerpos, lo cual puede ser resultado de la inmunidad pasiva (Coria y McClurkin, 1978b) conferido por el calostro.

Particularmente, en el caso de los animales jóvenes originarios de Chihuahua mostraron una neutralización prácticamente nula, es decir, que a pesar de ser animales vacunados contra los genotipos virales 1 y 2 los sueros no mostraron títulos; sin embargo se identificaron animales positivos al vDVB-1a, 1b, 1c y 2a, por lo tanto la presencia del genoma viral y la ausencia de anticuerpos anti-vDVB es sugerente de la presencia de animales PI. No así para el caso de los sueros de animales adultos los cuales mostraron actividad neutralizante del vDVB, aunque también se identificaron animales positivos.

Se realizó una segunda corrida de NV, pero en esta ocasión los sueros positivos por RT-PCR fueron sustituidos por suero negativo al vDVB y libre de anticuerpos. Los resultados de estas NV demuestran variaciones en el título de anticuerpos lo cual puede suceder por las siguientes razones:

- Si los animales son PI su suero contiene una cantidad significativa de virus pero no de anticuerpos y al retirar los sueros positivos del *pool* el título de anticuerpos tiende a subir, ya que los virus contenidos en las muestras positivas son neutralizados por los anticuerpos de las otras muestras en el *pool*.
- Si los animales están cursando una infección aguda los sueros tendrán anticuerpos como respuesta a dicha infección, por lo que una vez que las muestras positivas son removidas del *pool*, el título de anticuerpos disminuye.

El perfil serológico tanto de animales jóvenes como de adultos es el reflejo de su exposición al virus a lo largo de sus vidas, incluso en algunos casos nos puede ayudar a inferir infecciones persistentes; por lo que un monitoreo constante de animales adultos y sus crías nos puede ayudar a establecer el estatus zoonosanitario de la población analizada (Lindberg *et al.*, 2006).

La DVB al ser una enfermedad con una amplia gama de manifestaciones clínicas, genera un impacto económico en la industria ganadera con un costo de

hasta 46 millones de dólares por año aproximadamente; sin embargo, el cálculo de las pérdidas en los brotes de la DVB son significativamente variables, ya que el daño causado por la enfermedad es distinto de hato en hato, independientemente de la metodología utilizada para calcular dichas pérdidas (Bennett *et al.*, 1999); y si a esto le agregamos que en la mayoría de los casos las pérdidas calculadas sólo incluyen las causadas por los efectos directos de la DVB, como abortos y muerte, mientras que efectos indirectos como el incremento en el riesgo de contraer otras enfermedades nos son incluidas, hacen que el cálculo de las pérdidas sea aún más variable (Houe Hans, 2003). Debido a lo anterior, diversos países llevan a cabo la caracterización de los aislamientos del vDVB obtenidos en sus poblaciones, con el objetivo de determinar las cepas predominantes, las cuales deben consideradas al momento de implementar programas de control-erradicación, así como de vacunación. (Ridpath, 2010). Los aislamientos obtenidos en diferentes regiones del mundo, en su mayoría, han sido analizados por medio de las técnicas de RT-PCR, secuenciación y análisis filogenéticos por lo que han segregado los virus aislados en los diversos genotipos y subgenotipos del vDVB (Ridpath *et al.*, 1994; Mahony *et al.*, 2005; Jackova *et al.*, 2008; Otonel *et al.*, 2014; Arias *et al.*, 2003). La clasificación genética más común se basa en la comparación de la secuencia nucleotídica de la región 5'UTR y N^{pro} (Tajima *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2008; Booth *et al.*, 2013).

En México, la información acerca de la situación epidemiológica actual de la DVB es limitada. A pesar de que la DVB es reconocida por la OIE y SAGARPA como una enfermedad endémica y de notificación obligatoria [ACUERDO], la información proporcionada no especifica los linajes virales predominantes [Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica]. Adicionalmente, los datos disponibles sobre el vDVB se basan solo en la detección de anticuerpos contra éste; los cuales reportan una seroprevalencia que va del 12.27% (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2007) al 75% (Saldívar *et al.*, 2009; Suzan *et al.*, 1983; Correa *et al.*, 1974) en diversas regiones de México; sin embargo, ninguno de estos estudios

presenta información acerca de los genotipos o los subgenotipos que circulan en la población ganadera nacional.

El objetivo del este trabajo fue genotipificar las variantes del vDVB presentes en ganado bovino proveniente de diversas regiones de nuestro país; por lo que se analizaron 417 muestras de suero y 265 muestras de capa flogística.

El análisis de los fragmentos secuenciados que se obtuvieron a partir de amplificadas de sueros de bovinos mostraron una alta identidad con los genotipos 1a, 1b, 1c y 2a. De las muestras positivas totales, el 11.76% de las secuencias fueron clasificadas como vDVB-1a, el 4.41% como vDVB-1b y un 75% como vDVB-1c; siendo el genotipo 1 el más detectado, seguido del tipo 2 y sin ningún resultado positivo para el genotipo 3.

Los resultados obtenidos revelan la presencia de por lo menos cuatro subgenotipos del vDVB en las poblaciones ganaderas analizadas; similar a lo encontrado en los trabajos de Gómez-Romero *et al.*, y López-Pérez *et al.*, en donde se logró identificar los genotipos 1a y 1b, no así el 1c provenientes de suero de bovino. En Estados Unidos, las variantes 1a y 1b, se han establecido como los subgenotipos predominantes en el ganado (Ridpath *et al.*, 1994); debido a esto es común encontrar estos subgenotipos como contaminantes del suero fetal bovino en un 20% al 50% de los lotes comerciales en el país (Bolin y Ridpath, 1998). De la misma manera son las variantes virales predominantes en Canadá (Pellerin *et al.*, 1994). Por otro lado, el vDVB-1c se ha detectado en países como Alemania (Tajima *et al.*, 2001), España (Arias *et al.*, 2003), Australia el cual lo tiene como subgenotipo predominante (Mahony *et al.*, 2005) y México siendo este estudio el que lo reporta por primera vez.

En el caso del vDVB-2, se sabe que es un virus endémico en países como Estados Unidos (Fulton *et al.*, 2005) y Brasil (Flores *et al.*, 2002) en donde se han detectado los subgenotipos a y b, mientras que el subgenotipo c solo se ha

detectado en Alemania (Jenckel *et al.*, 2014) y Brasil (Silveira *et al.*, 2015). En el presente estudio se detectó la presencia del subgenotipo 2a, aunque en una menor proporción que el vDVB-1, lo cual coincide con lo descrito por algunos países en donde evidencian la presencia del vDVB-2, en baja frecuencia. (Booth *et al.*, 2013; Mahony *et al.*, 2005; Ridpath *et al.*, 2010). Lo anterior, puede ser explicado por el hecho de que las vacunas comerciales en nuestro país, a diferencia de las de vDVB-1, contienen como agente vacunal el subgenotipo 2a; sin embargo no existe evidencia que respalde esta idea.

La existencia de diferentes subgenotipos es un reflejo de la diversidad del vDVB, incluso se ha demostrado que dicha diversidad esta relacionada con variaciones antigénicas entre subgenotipos (Pogranichniy *et al.*, 2011) las cuales han sido evidenciadas por las diferencias en la neutralización cruzada (Bachofen *et al.*, 2008), unión a anticuerpos monoclonales (Bolin y Ridpath, 1998), respuesta a la vacunación en animales PI (Fulton *et al.*, 2003b). Cuando las vacunas contienen como cepas vacunales subgenotipos diferentes a las cepas de campo que se encuentran circulando en la población ganadera se tiene un impacto negativo en estrategias de control de la DVB (Fulton *et al.*, 2005). Problemática actual que acontece en México, y ésta puede tener como consecuencia el fracaso a la vacunación al no inducir una respuesta protectora eficaz en los animales contra las variedades del vDVB.

El vEF es un Pestivirus que produce la enfermedad de la frontera (EF) y que afecta pequeños ruminantes como ovinos y caprinos además de gamuzas (Marco *et al.*, 2008), cerdos (Kawanishi *et al.*, 2014), venados, bisonte europeo (Nettleton y Willoughby, 2008) e incluso a vacas (Hornberg *et al.*, 2009; Krametter-Frötscher *et al.*, 2008). La infección por el vEF esta caracterizada por provocar abortos, nacimiento de animales débiles o muertos en ovinos (Nettleton y Willoughby, 2008); en el caso de los bovinos se conoce muy poco sobre los efectos clínicos del virus; sin embargo, se sabe que tiene la capacidad de generar bovinos PI con vEF (Krametter-Frötscher *et al.*, 2008). Por lo general, las

infecciones interespecie ocurren de bovinos a ovinos (Danuser *et al.*, 2009); sin embargo, se han reportado casos en donde la infección con *Pestivirus* en bovinos proviene de ovinos (Krametter-Frötscher *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos sugieren que el ganado del cual se obtuvieron las muestras estuvieron en contacto con ovinos o caprinos portadores del vEF. El presente estudio es el primero en reportar la identificación del vEF en ganado bovino de origen mexicano. Los análisis filogenéticos de las secuencias revelaron que las muestras identificadas como NG49, NG52 y NG99 mostraron una identidad del 99.99%, 99.98% y 99.99% respectivamente, con la cepa de referencia vEF BD31 que pertenece al genotipo 1; el cual es el genotipo predominante en Estados Unidos (Ridpath y Bolin, 1997). El origen del vEF en México es desconocido, por lo que se requiere realizar más estudios que nos ayuden a dilucidar la prevalencia de dicho virus en ganado bovino, ovino y caprino así como su impacto en la producción de estas especies.

Adicionalmente, la muestra de suero identificada como NG12 tuvo una identidad del 100% con el virus de Pronghorn. Virus atípico aislado del antílope (*Antilocapra americana*) identificado y caracterizado por Vilcek *et al.*, en 2005; fue descrito como el virus más divergente dentro de los *Pestivirus* hasta el aislamiento y secuenciación del virus de Bungowannah (Kirkland *et al.*, 2007). Debido a que el virus identificado en este trabajo es el segundo virus de este tipo detectado hasta la fecha, la información acerca de aspectos epidemiológicos, como prevalencia o incidencia, así como la patogénesis aún son desconocidos (Neill *et al.*, 2014). Asimismo, se desconoce la fuente de infección por el virus de Pronghorn en los animales analizados. Se requiere realizar más estudios sobre las propiedades de dicho virus así como la detección de animales positivos, y así conocer el impacto del virus en la salud de los animales. La caracterización de nuevos *Pestivirus* puede contribuir a un mejor entendimiento de la evolución molecular de dicho virus (Vilcek *et al.*, 2005).

En el caso de las muestras de capa flogística, el total de resultados positivos detectados fueron siete. Debido a la baja calidad de algunas de las secuencias de las muestras positivas solo se pudo realizar el análisis filogenético con tres de ellas. La muestra identificada como NG127 mostró una identidad del 100% con la cepa de referencia NADL, la cual se utiliza como cepa vacunal en los productos comercializados en nuestro país. Por otro lado la muestra NG129 tuvo una identidad del 99.99% con la cepa New York 93 que pertenece al grupo del vDVB-2a y finalmente la muestra NG133 se agrupó en el clado del *Pestivirus* atípico Pronghorn.

A diferencia de las muestras de suero, en las muestras de capa flogística solo fue posible identificar los genotipos vDVB-1a, vDVB-2a y virus de Pronghorn y solo una de estas muestras coincide con el resultado positivo en suero. Lo anterior puede explicarse por el hecho de que el vDVB produce leucopenia en los animales infectados, disminuyendo la posibilidad de detectar el genoma por medio de RT-PCR en las células blanco (Brownlie *et al.*, 2000).

La detección del vEF y del virus de Pronghorn circulando en ganado de México es un hallazgo importante ya que son virus que no han sido detectados con anterioridad en nuestro país, demostrando que diversos tipos del vDVB pueden encontrarse en el ganado bovino.

La información derivada de este tipo de estudios contribuye a tener un mejor entendimiento en los aspectos de diversidad y epidemiología del vDVB. De la misma manera, la caracterización de nuevos *Pestivirus* puede contribuir a un mejor entendimiento de la evolución molecular de dichos virus (Vilcek *et al.*, 2005). Contribuyendo en el diseño de métodos diagnósticos precisos y el desarrollo de inmunógenos eficaces contra el vDVB, tanto para *Pestivirus* típicos como para atípicos, que ayuden a prevenir y controlar las enfermedades causadas por estos e incluso detectarlos como contaminantes en productos de origen bovino y así evitar su diseminación en animales susceptibles

8. Conclusiones

- I. Los iniciadores utilizados en este estudio son capaces de detectar ARN de vDVB tanto típicos como atípicos.
- II. Se encontró evidencia de la presencia de ácidos nucleicos del virus de la diarrea viral bovina en el 16.30% de las muestras analizadas.
- III. Con base en el análisis de secuencias se demostró que los virus identificados predominantes corresponden al vDVB tipo1a, vDVB-1b, vDVB-1c y al vDVB-2a.
- IV. No se detectó la presencia del genotipo 3 o *HoBi-like* en las muestras analizadas.
- V. Se evidenció por primera vez la presencia del vEF y Pronghorn en sueros de bovinos provenientes de los estados de Veracruz y Morelos.

9. Prospectiva

- Establecer el estatus zoonosario de las poblaciones ganaderas de México.
- Establecer el uso de los iniciadores utilizados en este estudio y RT-PCR como técnica de diagnóstico, con el fin de reducir el riesgo de diseminación de esta enfermedad en los animales de abasto.
- Determinar si existen variaciones antigénicas entre los subgenotipos identificados.
- Realizar monitoreos continuos de la población ganadera con el fin de detectar nuevas variantes genéticas del vDVB, así como su impacto en salud animal.
- Proponer ante autoridades zoonosarias, a través del CONASA, el uso de inmunógenos que contengan como agente vacunal las variantes del vDVB endémicas de la región o en su defecto del país.
- Realizar estudios epidemiológicos para determinar y caracterizar las variantes genéticas del vEF, así como de virus de Pronghorn que circulan en ovinos y bovinos.
- Determinar el impacto del vEF en la salud de bovinos así como de ovinos y caprinos.
- Determinar el impacto del virus de Pronghorn en la salud de bovinos.

10. Referencias

- 1) [ACUERDO] mediante el cual se enlistan las enfermedades y las plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. [Word: 20 de septiembre de 2007] Ciudad de México. DOF. http://dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=5001157. [consulta: enero de 2015]
- 2) Agapov EV, Murray CL, Frolov I, Qu L, Myers TM, Rice CH M. 2004. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoeavirus. *J. Virol.* 78: 2414-2425.
- 3) Agnello V, Ábel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. 1999. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 12776-12771.
- 4) Alenius S, Lindberg A. & Larsson B. 1997. A national approach to the control of bovine viral diarrhoea virus. *In Proc. 3rd ESVV symposium on Pestivirus infections, 19-20 September 1996, Lelystadt, the Netherlands* (S. Edwards, D.J. Paton & G. Wensvoort, eds). Central Veterinary Laboratory, Weybridge, United Kingdom, 162-169.
- 5) Andrew M. Q. King, Michael J Adams, Eric B Cartens and Elliot J Lefkowitz. 2012. Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. International union of microbiology societies. Virology Division. *Elsevier*. 1011-1014.
- 6) Ansari IH, Chen LM, Liang D, Gil LH, Zhong W, Donis RO. 2004. Involvement of a bovine viral diarrhoea virus NS5B locus in virion assembly. *J. Virol.* 78: 9612-9623.
- 7) Antonis AF, Bouma A, de Bree J, de Jong MC. 2004. Comparison of the sensitivity of in vitro and in vivo tests for detection of the presence of a bovine viral diarrhoea virus type 1 strain. *Vet Microbiol.* 102 (3-4):131- 40.
- 8) Arias P, Orlich M, Prieto M, Cedillo-Rosales S, Thiel HJ, Alvarez M, Becher P. 2003. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. *Vet. Microbiol.* 96, 327–336.
- 9) Barkema HW, Bartels CJ, van Wuijckhuise L, Hesselink JW, Holzhauer M, Weber MF, Franken P, Kock PA, Bruschke CJ, Zimmer GM. 2001. Outbreak of bovine virus diarrhoea on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhoea virus type 2. *Tijdschr Diergeneeskde*, 126 (6):158–65.
- 10) Baker JC. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc.* 190: 1449-1458.
- 11) Baker JC. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. North Am.* 11 (3):425-445.
- 12) Baigent SJ, Zhang G, Fray MD, Flick-Smith H, Goodbourn S, McCauley JW. 2002. Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. *J Virol.* 76:8979e88.
- 13) Baigent SJ, Goodbourn S, McCauley JW. 2004. Differential activation of interferon regulatory factors-3 and -7 by non-cytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 100:135-44.
- 14) Bauermann FV., Flores EF., Falkenberg SM., Weiblen R, Ridpath JF. 2014. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(1):10-7.
- 15) Becher P, Orlich M, Kosmidou A, König M, Baroth M, Thiel HJ. 1999. Genetic diversity of Pestiviruses: identification of novel groups and implication for classification. *Virology*, 262, 64–71.
- 16) Becher P, Orlich M, Shannon AD, Horner G, König M, Thiel HJ. 1997. Phylogenetic analysis of Pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol.* 78:1357–1366.
- 17) Becher P, König M, Paton DJ, Thiel HJ. 1995. Further characterization of border disease virus isolates: Evidence for the presence of more than three species within the genus Pestivirus. *Virology*, 209:200–206.
- 18) Becher P, Thiel HJ, Collins M, Brownlie J, Orlich M. 2002. Cellular Sequences in Pestivirus Genomes Encoding Gamma-Aminobutyric Acid (A) Receptor-Associated Protein an Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16 Kilodaltons. *J Virol.* 76 (24): 13069-13076.

- 19) Becker Y. 2000. Evolution of viruses by acquisition of cellular RNA or DNA nucleotide sequences and genes: an introduction. *Virus Genes*, 21(1–2):7–12.
- 20) Bennett RM, Christiansen K, Clifton-Hadley RS. 1999. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. *Journal of Dairy Research*, 66:455–9.
- 21) Betancur H, Gogorza LM, Martínez FG. 2007 Seroepidemiology of the bovine viral diarrhoea in the municipality of Montería-Cordoba-Colombia. *Analecta Veterinaria*, 27 (2)
- 22) Bielefeldt-Ohmann H. 1983. Pathogenesis of bovine viral diarrhoea–mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. *Res Vet Sci*. 34: 5–10.
- 23) Bitsch V, Ronsholt L. 1995. Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 11:627–40.
- 24) Bitsch V, Hansen KEL, Rønsholt L. 2000. Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994–1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Vet. Microbiol*. 77, 137–143.
- 25) Biuk-Rudan N, Cvetnić S, Madić J, Rudan D. 1999. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology*. Apr 1;51(5):875-81.
- 26) Bolin SR. 1995. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 11(3):615-25.
- 27) Bolin SR, Matthews PJ, Ridpath JF. 1991. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest*. 3, 199-203.
- 28) Bolin SR, Ridpath JF. 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am J Vet Res*. 53: 2157-2163.
- 29) Bolin SR, Ridpath JF. 1995. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhoea virus in calves. *Am J Vet Res* 56 (6): 755-759.
- 30) Bolin SR, Ridpath JF. 1998. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J Vet Diagn Invest*, 10(2):135–9.
- 31) Booth RE, Thomas CJ, El-Attar LMR, Gunn G, Brownlie J. 2013. A phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from six different regions of the UK and links to animal movement data. *Vet. Res*. 44, 43.
- 32) Boulanger D, Waxweiler S, Karelle L, Loncar M, Mignon B, Dubuisson J, Thiry E, Pastoret PP. 1991. Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum. *J. gen. Virol*. 72: 1195-1198.
- 33) Braun RK, Kendrick JW. 1973. Immunologic response of bovine fetus to bovine viral diarrhoea virus. *Am j Vet Res*. 34:1127-32.
- 34) Brock KV, Redman DR, Vickers ML, Irvine NE. 1991. Quantitation of bovine viral diarrhoea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3, 99-100.
- 35) Brodersen BW y Kelling CL. 1999. Alteration of Leukocyte Populations in Calves Concurrently Infected with Bovine Respiratory Syncytial Virus and Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Viral Immunology*. 12(4): 323-334.
- 36) Brownlie J. 2005. Bovine virus diarrhoea virus -strategic directions for diagnosis and control, *BVDV Symposium 2005*. VetLearn, Massey University, Palmerston North, Wellington, New Zealand, pp.1-19.
- 37) Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ, Pocock DH. 1987. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann Rech Vet*, 18, 157-66.
- 38) Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec*. 114:535–536.

- 39) Brownlie J, Thompson I, Curwen A. 2000. Bovine virus Diarrhoea virus-strategic decisions for diagnosis and control. *In Practice*, 176-187.
- 40) Broes A, Wellemans G, Dheedene J. 1992. Syndrome hémorragique chez des bovines infectés par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD/MD). *Ann Med Vet.*137:33–38.
- 41) Brusckke CJ, Weerdmeester K, van Oirschot JT, van Rijn PA. 1998a. Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet Microbiol.* 64:23–32.
- 42) Brusckke CJ, Haghparast A, Hoek A, Rutten VP, Wentink GH, van Rijn PA, van Oirschot JT. 1998b. The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol* 62:37–50.
- 43) Brusckke CJ, Moormann RJ, van Oirschot JT, van Rijn P.A. 1997. A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. *Vaccine*, 15(17-18):1940-5.
- 44) Cano CP, Lastra EM, García DG, Ramírez LJ, Retana RA, Monroy LF. 2009. Diagnóstico seroepidemiológico de las principales enfermedades en los bovinos de la zona norte de Chiapas. *Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Buiatría*. 6 agosto, Chiapas, México.
- 45) Carman S, van Dreumel T, Ridpath J, Hazlett M, Alves D, Dubovi E, Tremblay R, Bolin S, Godkin A, Anderson N. 1998. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *J Vet Diagn Invest.* 10(1):27–35.
- 46) Charleston B, Fray MD, Baigent S, Carr BV, Morrison WI. 2001. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol.* 82(Pt 8):1893-7.
- 47) Childs, T. 1946. "X disease in cattle - Saskatchewan." *Can J Comp Med.* 10:316-319.
- 48) Chon SK, Perez DR, Donis RO. 1998. Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, 251:370–382.
- 49) Coggins L, Gillespie JH, Robson DS, *et al.*, 1961."Attenuation of virus diarrhoea virus (Strain Oregon C24V) for vaccine purposes." *Cornell Vet.* 51: 539-545.
- 50) Collett MS, Larson R, Gold C, *et al.*, 1988a. Molecular cloning and nucleotide sequence of the Pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165:191–199.
- 51) Collett MS, Larson R, Belzer SK, Retzel E. 1988b. Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a Pestivirus. *Virology* 165.1: 200-208.
- 52) Coria MF, McClurkin AW. 1978a. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc.*172:449–451.
- 53) Coria MF, McClurkin AW. 1978b. Duration of active and colostrum-derived passive antibodies to bovine viral diarrhoea virus in calves. *Can J Comp Med.* 42(2):239-43.
- 54) Corapi WV, Donis RO, Dubovi EJ. 1988. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. *J Virol.* 62: 2823-2827.
- 55) Corapi WV, Elliott RD, French TW, Arthur DG, Bezek DM, Dubovi EJ. 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc.* 196:590–596
- 56) Cordova-Izquierdo A, Córdova-Jiménez CA, Córdova-Jiménez MS, Saltijeral-Oaxaca JA, Ruiz-Lang CG, Xolalpa-Campos VM, Cortés-Suárez S, Guerra- Liera JE. 2007. Seroprevalence of cattle abortive diseases from Mexican humid tropic. *Rev. vet.* 18: 2, 139–142.
- 57) Cortez A, Heinemann MB, De Castro AMMG, Soares RM, Pinto AMV, *et al.*,. 2006. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 59-UTR region. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 26: 211–216.
- 58) Correa, G. P., Brown, L. N. & Bryner, J. H. 1974. Presencia de anticuerpos contra rinotraqueitis infecciosa, diarrea viral bovina, parainfluenza 3, brucelosis, leptospirosis, vibriosis y Haemophilus somnus en sueros de bovinos con problemas patológicos reproductores y respiratorios. *Tee. Pee. Alex.* 29, 26-33.

- 59) Couvreur B, Letellier C, Collard A, Quenon P, Dehan P, Hamers C, Pastoret P, Kerkhofs P. 2002. Genetic and Antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Research*, 85:17-28.
- 60) Curwen A. 1999. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds-Control for the future. *BCVA* 7:5-9.
- 61) Danuser R, Vogt HR, Kaufmann T, Peterhans E, Zaroni R, 2009. Seroprevalence and characterization of pestivirus infections in small ruminants and new world camelids in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 151, 109-117.
- 62) David GP, Crawshaw TR, Gunning RF, Hibberd RC, Lloyd GM, Marsh PR. 1994. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet Rec*,134:468-472.
- 63) Darbyshire JH. 1962. Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of cattle. II. A serological relationship between mucosal disease and swine fever. *Res Vet Sci.* 3:125-128.
- 64) Decaro N, Lucente MS, Mari V, Cirone F, Cordioli P, Camero M, Sciarretta R, Losurdo M, Lorusso E, Buonavoglia C. 2011. Atypical Pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg Infect Dis.* 17: 1549-1552.
- 65) Deng R, Brock KV.1993. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acid Res.*21:1949-1957.
- 66) Deregt D. 2005. Introduction and history. En: Goyal SM, Ridpath JF, editors. Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control. Ames, IA: Blackwell Publishing. p. 3-34.
- 67) Donis RO. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Food Anim. Pract.* 11: 393-423.
- 68) Donis RO, Corapi W, Dubovi EJ. 1988. Neutralizing Monoclonal Antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus Bind to the 56K to 58K Glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 69: 77-86.
- 69) Donis RO, Dubovi EJ. 1987. Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus biotypes. *Am J Vet Res.* 48(11): 1549-54.
- 70) Dubovi EJ. 1992. Genetic diversity and BVD virus. *Comp. Immun. Microbiol Infec Dis.* 15:155-62.
- 71) Edwards S. 1990. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. Sci. Tech.* 9: 115-130.
- 72) Edwards S. 1997. Observations of bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds, and the response to different control strategies. En: Proceedings of the *Third ESVV Symposium on Pestivirus Infections*, Lelystad, The Netherlands, 19-20 September 1996, pp. 173-176.
- 73) Elbers K, Tautz N, Becher P, Stoll D, Rüménapf T, Thiel HJ. 1996. Processing in the Pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2-p7. *J. Virol.* 70: 4131-4135.
- 74) Fairbanks K, Schnackel J, Chase CC. 2003. Evaluation of a modified live virus type-1a bovine viral diarrhoea virus vaccine (Singer strain) against a type-2 (strain 890) challenge. *Vet Ther.* 4(1):24-34.
- 75) Falcone E, Tollis M, Conti G. 1999. Bovine viral diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine.* 14:18 (5-6):387-8
- 76) Falcone E, Cordioli P, Tarantino M, Muscillo M, Sala G, La Rosa G, Archetti IL, Marianelli C, Lombardi G, Tollis M. 2003a. Experimental infection of calves with Bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV2) isolated from a contaminated vaccine. *Veterinary Research Communications*, 27: 577-589.
- 77) Falcone E, Cordioli P, Tarantino M, Muscillo M, La Rosa G, Tollis M. 2003b. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus in Italy. *Vet. Res. Commun.* 27, 485-494.
- 78) Felsenstein J. 1985. Confidence limits of phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- 79) Fernelius AL, Amtower WC, Lambert G, McClurkin AW, Matthews PJ. 1973, Bovine viral diarrhoea in swine: Characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. *Can J Comp Med* 37:13-20.

- 80) Fetzner C, Tews BA, Meyers G. 2005. The carboxy-terminal sequence of the Pestivirus glycoprotein Erns represents an unusual type of membrane anchor. *J Virol.* 79, 11901–11913.
- 81) Fiebach AR, Guzylack-Piriou L, Python S, Summerfield A, Ruggli N.. 2011 Classical swine fever virus Npro limits type I interferon induction in plasmacytoid dendritic cells by interacting with interferon regulatory factor 7. *J Virol.* 85:8002-11.
- 82) Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. 2009. Principles of virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. Third edition. USA.
- 83) Flores EF, Ridpath JF, Vogel FS, Gil LH. 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.* 87(1):51–60.
- 84) Fox FH: 1996. Historic clinical perspective. *Int Symp Bovine Viral Diarrhoea Virus: A 50 Year Review June 23–25.* Ithaca, New York, pp. 1–4.
- 85) Frey HR, Flebbe U, and Leiss B. 1996. Prevalenz und klinische symptomatik persistenter BVD - virusinfektionen in Rhinderbeständen Niedersachens. *Der praktische Tierarzt*, 77, 49-52.
- 86) Fulton RW, Purdy CW, Confer AW, Saliki JT, Loan RW, Briggs RE, Burge LJ. 2000. Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res.* 64(3): 151–159.
- 87) Fulton RW, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME. 2003a. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals*, 31(2):89–95.
- 88) Fulton RW, Step DL, Ridpath JF, Saliki JT, Confer AW, Johnson BJ, Briggs RE, Hawley RV, Burge LJ, Payton ME. 2003b. Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and Mannheimia haemolytica bacterin-toxoid. *Vaccine*, 21(21–22):2980–5.
- 89) Fulton RW, Ridpath JF, Ore S, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME. 2005. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet Microbiol.* 111(1-2):35-40.
- 90) Gates MC, Woolhouse MEJ, Gunn GJ, Humphry RW. 2013. Relative associations of cattle movements, local spread, and biosecurity with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) seropositivity in beef and dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 112: 285–295.
- 91) Gillespie JH, Baker JA, McEntee K. 1960. "A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus" *Cornell Vet.* 50: 73-79.
- 92) Gillespie JH, Coggins L, Thompson J, Baker JA. 1961. Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease. *Cornell Vet* 51:155–159.
- 93) Goens D. 2002. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Can. Vet. J.* 43: 946-954.
- 94) Gómez-Romero N. 2013. Aplicación de técnicas moleculares para la identificación del virus de la diarrea viral bovina en vacunas de uso veterinario [tesis de licenciatura]. Ciudad de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- 95) Guindon S, and O Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- 96) Graham DA, Calvert V, Mooney J, Crawford J, Clery D. 2004. – Birth of persistently infected calves in two herds using inactivated vaccines. *In Proc. 2nd European Symposium on BVDV control*, 20-22 October, Oporto, Portugal, 87.
- 97) Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*, 535,1-3: 34-38.
- 98) Grooms DL. 2006. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and

- leptospirosis. *Theriogenology* 66: 624-628.
- 99) Grummer B, Beer M, Liebler-Tenorio E, Greiser-Wilke I. 2001. Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* 82: 2597- 2605.
 - 100) Gu B, Liu C, Lin-Goerke J, Maley DR, Gutshall LL, Feltenberger CA, and Del Vecchio AM. 2000. The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhoea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J. Virol.* 74:1794–1800.
 - 101) Gunn HM. 1993. Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 132, 584±585.
 - 102) Gunn G, Saatkamp H, Humphry R, Stot A. 2005. Assessing economic and social pressure for the control of BVDV. *Prev Vet Med.* 72: 149-162.
 - 103) Haines DM, Chelack BJ. 1991. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues form diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 101-112.
 - 104) Haines DM, Martin KM, Clark EG, Jim GK, Janzen ED. 2001. The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhoea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *Can Vet J.* 42(11): 857–860.
 - 105) Hall TA. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
 - 106) Harada T, Tautz N, Thiel HJ. 2000. E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol.* 74.20: 9498-9506
 - 107) Haider N, Rahman MS, Khan SU, Mikolon A, Gurley ES, Osmani MG, Shanta IS, Paul SK, Macfarlane-Berry L, Islam A, Desmond J, Epstein JH, Daszak P, Azim T, Luby SP, Zeidner N, Rahman MZ. 2014. Identification and epidemiology of a rare HoBi-like Pestivirus strain in Bangladesh. *Transbound Emerg Dis.* 61(3):193-8.
 - 108) Harasawa R, Giangaspero M. 1998. A novel method for pestivirus genotyping based on palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. *J. Virol. Methods* 70:225–230.
 - 109) Heimann M, Roman-Sosa G, Martoglio B, Thiel HJ, Rumenapf T. 2006. Core protein of Pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J. Virol.* 80: 1915-1921.
 - 110) Hewicker-Trautwein M, Trautwein G, Frey H-R, Liess B. 1997. Immunohistochemical studies of organ tropism of different biotypes of BVD virus in experimentally infected sheep fetuses. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 104: 436–439.
 - 111) Heuer C., Healy A., Zernini C. 2007. Economic Effects of Exposure to Bovine Viral Diarrhoea Virus on Dairy Herds in New Zealand. *J. Dairy Sci.* 90:5428–5438
 - 112) Holmquist, G, Toomik R, Rodgers S, Lawrence J, Ballagá A. 2002. Laboratory diagnosis of BVDV by using ELISA for antigen and antibody detection. In *Detecting and controlling BVDV infections: Conference proceedings*, pp. 27. Ames, Iowa, 4-5 April 2002.
 - 113) Hilton L, Moganeradj K, Zhang G, Chen YH, Randall RE, McCauley JW, Goodbourn S. 2006. The NPro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *J Virol.* 80(23):11723–32.
 - 114) Hornberg A, Fernández SR, Vogl C, Vilcek S, Matt M, Fink M, Köfer J, Schöpf, K. 2009. Genetic diversity of Pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet. Microbiol.* 135 (3–4), 205–213.
 - 115) Houe H, y Meyling A. 1991a. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Preventive Veterinary Medicine*, 11, 9-16.
 - 116) Houe H. y Meyling A. 1991b. Surveillance of cattle herds for bovine virus diarrhoea virus (BVDV)-infection using data on reproduction and calf mortality. *Arch Virol.* S3:157–64.
 - 117) Houe H, Pedersen KM, Meyling A. 1993. A computerized spread sheet model for calculating total annual national losses due to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infection in dairy herds and sensitivity analysis of selected parameters. En: Edwards S (editor), *Proceedings of the Second Symposium on ruminant Pestiviruses*, Annecy,

France 1st–3rd October 1992. 179–184

- 118) Houe H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North America: Food Animal Practice*, 11: 521-547.
- 119) Houe H. 1996. Bovine virus diarrhoea virus (BVDV): Epidemiological studies of the infection among cattle in Denmark and USA. In Thesis: The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark
- 120) Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, 64, 89-107.
- 121) Houe, H., 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*, 31, 137–143
- 122) Houe H, Lindberg A, Moennig V. 2006. Test strategies in Bovine Viral Diarrhoea Virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest*. 18: 427-36.
- 123) House JA, Manley M. 1973. Comments on passive immunity to bovine viral diarrhoea. *J Am Vet Med. Assoc.* 163:819-820.
- 124) Howard CJ, Brownlie J, Clarke MC. 1987. Comparison by the neutralization assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet Microbiol*. 13: 361-369.
- 125) Howard CJ, Clarke MC, Brownlie J. 1989. Protection against respiratory infection with bovine viral diarrhoea virus by passively acquired antibody. *Vet. Microb*. 19: 195-203.
- 126) Howard CJ, Clarke MC, Sopp P, Brownlie J. 1992. Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol*. 32.3 – 4; 303-314.
- 127) Iang Rondón. 2006. Diarrea Viral Bovina: Patogénesis e inmunopatología. *Rev. MVZ Córdoba*, 11 (1):694-704
- 128) Iqbal M, Poole E, Goodbourn S, McCauley JW. 2004. Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol*. 78(1):136–45.
- 129) Jackova, A, Novackova M, Pelletier C, Audeval C, Gueneau E, Haffar A, Petit E, Rehby L, Vilcek S. 2008. The extended genetic diversity of BVDV-1: typing of BVDV isolates from France. *Vet. Res. Commun*. 32 (1), 7–11.
- 130) Jenckel M, Höper D, Schirmeier H, Reimann I, Goller KV, Hoffmann B, Beer M. 2014. Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus detected by deep sequencing. *J Virol*. 88(12):6983-92. doi: 10.1128/JVI.00620-14.
- 131) Johnson DW, Muscoplat CC. 1973. Immunologic abnormalities in calves with chronic bovine viral diarrhoea. *Am J Vet Res*. 34:1139–1141.
- 132) Jones L R, Zandomeni R, Weber LE. 2001. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Veterinary Microbiology*, 81:367-375.
- 133) Kadir Y, Christine F, Barbara BW, Zeki Y, Feray A, Aykut O, Ibrahim B, Sibilina Cedillo R, Heinz-Jürgen T, Matthias K. 2008. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a new subgroup in BVDV-1. *Vet. Microbiol*. 130 (3–4), 258–267.
- 134) Kawanishi N., Tsuduku S, Shimizu H, Ohtani Y, Kameyama K, Yamakawa M, Tsutsui T, Matsuura K, Ohashi S, Isobe T, Yamada S. 2014. First isolation of border disease virus in Japan is from a pig farm with no ruminants. *Veterinary Microbiology*, Volume 171, Issues 1–2, 25 Pages 210-214.
- 135) Krametter-Frötscher R, Benetka V, Möstl K, Baumgartner WW, 2008. Transmission of Border disease virus from sheep to calves a possible risk factor for the Austrian BVD eradication programme in cattle? *Wien. Tierärztl. Monatsschr*. 95, 200–203.
- 136) Kelling C. 2004. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Vet Clin Food Anim*. 20: 115-129.
- 137) Kelling CL, Steffen DJ, Cooper VL, Higuchi DS, Eskridge KM. 2002a. Effect of infection with bovine viral diarrhoea virus alone, bovine rotavirus alone, or concurrent infection with

- both on enteric disease in gnotobiotic neonatal calves. *Am J Vet Res* 63:1179–1186.
- 138) Kelling CL, Steffen DJ, Topliff CL, Eskridge KM, Donis RO, Higuchi DS. 2002b. Comparative virulence of isolates of bovine viral diarrhea virus type II in experimentally inoculated six- to nine-month-old calves. *Am J Vet Res.* 63(10):1379–84.
- 139) Kennedy P, Collier JC, Ramsey F, McKercher D, Collier JC, Fox FH. 1968. Report of the ad hoc committee on terminology for the symposium on immunity to the bovine respiratory disease complex. *J Am Vet Med Assoc* 152:940.
- 140) Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16:111-120
- 141) Kirkland P, McGowan M, Mackintosh S. 1993. Factors influencing the development of persistent infection in cattle with Pestivirus. En: Proceedings of the second symposium on Pestiviruses. P. 117-21.
- 142) Kirkland PD, Frost MJ, Finlaison DS, King KR, Ridpath JF, Gu X. 2007. Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: a possible new species of Pestivirus. *Virus Res.* 129:26–34.
- 143) Kniazeff AJ, Huck RA, Jarrett WFH, *et al.*, 1961, Antigenic relationship of some bovine viral diarrhoea- mucosal disease viruses from the United States, Great Britain, and West Germany. *Vet Rec* 73:768–769.
- 144) Krametter-Frötscher R, Benetka V, Möstl K, Baumgartner WW, 2008. Transmission of Border disease virus from sheep to calves a possible risk factor for the Austrian BVD eradication programme in cattle? *Wien. Tierärztl. Monatsschr.* 95, 200–203.
- 145) Kummerer BM, Stoll D, Meyers G. 1998. Bovine viral diarrhea virus strain *Oregon*: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. *J Virol.* 72: 4127-4138.
- 146) Kummerer, B.M.; Meyers, G. 2000. Correlation between Point Mutations in NS2 and the Viability and Cytopathogenicity of Bovine Viral Diarrhea Virus Strain *Oregon* Analyzed with an Infectious cDNA Clone. *J. Virol.* 74: 390-400.
- 147) Kümmerer BM, Tautz N, Becher P, Thiel H, Meyers G. 2000. The genetic basis for cytopathogenicity of Pestiviruses. *Veterinary Microbiology*, 77: 117±128.
- 148) Lackner T, Müller A, Pankraz A, Becher P, Thiel HJ, Gorbalenya AE, Tautz N. 2004. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J. Virol.* 78,19: 10765-10775.
- 149) Lambot M, Douart A, Joris E, Letesson J, Pastoret P. 1997. Characterization of immune response of cattle against noncytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhea virus. *J Gen Virol.* 78: 1041-1047.
- 150) Lang-Ree JR, Vatn T, Kommisrud E, Lùken T. 1994. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. *Vet. Rec.* 135, 412±413.
- 151) Langedijk JP, VanVeelen PA, Schasper WM, De ru AH, Meloen RH, Hulst MM. 2002. A structural model of Pestivirus E(rns) based on disulfide bond connectivity and homology modeling reveals an extremely rare vicinal disulfide. *J. Virol.* 76: 10383-10392
- 152) Laureyns J, Ribbens S, de Kruif A. 2010. Control of bovine viral diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives on the detection of persistently infected cattle. *The Veterinary Journal*, 184 ;21-26
- 153) Larson RL, Grotelueschen DM, Brock KV, Dargatz DA, Ellis JA, Hunsaker BD, Lewis SD, MacGregor DS, Smith RA, Sprowls RW, Traffas V. 2004. BVD decision/management guidelines for beef veterinarians. *Bov. Practit.* 38 (1), 103-112.
- 154) Lecot S, Belouzard S, Dubuisson J, Rouille Y. 2005. Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 79: 10826–10829.
- 155) Lértora, W.J. 2003. Diarrea viral bovina: actualización. *Rev. Vet.* 14:1.
- 156) Lee KM, Gillespie JH. 1957. Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. *Am J Vet Res* 18:952–953
- 157) Letellier, C., Kerkofs, P. 2003. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. *J. Virol. Methods* 114:21-27.

- 158) Liang, D, Fernández-Sainz I, Ansari IH, Gil LHVG, Vassilev V, Donis RO. 2003. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant Pestivirus. *J. Gen. Virol.* 84: 1269-1274.
- 159) Lindberg A, Alenius S. 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infectious in cattle populations. *Vet Microbiol* 64: 97-222.
- 160) Lindberg A, Houe H. 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Preventive Veterinary Medicine*, 72; 55–73.
- 161) Lindberg A, Browlie J, Gunn G, Houe H, Moennig V. 2006. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev sci tech off int Epiz.* 25:961-979.
- 162) Liu L, Xia H, Wahlberg N, Belák S, Baule C. 2009a. Phylogeny, classification and evolutionary insights into Pestiviruses. *Virology*, 385 351–357
- 163) Liu L, Xia H, Baule C, Belák S. 2009b. Maximum likelihood and Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic characterization of a novel Pestivirus, SVA/cont-08. *Arch Virol.* 154: 1111–1116.
- 164) Liu L, Kampa J, Belák S, Baule C. 2009c. Virus recovery and full-length sequence analysis of the atypical bovine Pestivirus Th/04_KhonKaen. *Vet Microbiol.* 138: 62–68.
- 165) Liu L, Lehmkühl HD, Kaeberle ML. 1999. Synergistic effects of bovine respiratory syncytial virus and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection on selected bovine alveolar macrophage functions. *Can J Vet Res.* 63(1): 41–48
- 166) López-Pérez TJ. 2014. Genotipificación de virus de la diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros. [Tesis de maestría]. Ciudad de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- 167) Loy JD, Gander J, Mogler M, Vander Veen R, Ridpath J, Harris DH, Kamrud K. 2013. Development and evaluation of areplicon particle vaccine expressing the E2 glycoprotein of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle. *Virology Journal.* 10:33
- 168) Loken T, Krogsrud J, Larsen IL. 1991a. Pestivirus infections in Norway. Serological investigations in cattle, sheep and pigs. *Acta Vet Scand.* 32:27–34.
- 169) Loken T, Krogsrud J, Bjerkås I. 1991b. Outbreaks of border disease in goats induced by a Pestivirus contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J. Comp. Path.* 104, 195±209.
- 170) Marco I, Rosell R, Cabezón O, Mentaberre G, Casas E, Velarde R, López-Olvera, Ana Hurtado JR, Lavín S. 2008. Epidemiological study of border disease virus infection in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). *Veterinary Microbiology*, Volume 127, Issues 1–2, 5, Pages 29-38.
- 171) Mahony TJ, McCarthy FM, Gravel JL, Corney B, Young PL, Vilcek S. 2005. Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. *Vet. Microbiol.* 106, 1–6.
- 172) Mahy BWh, Van Regenmortel MHV. 2010. Desk encyclopedia of animal and bacterial viruses. *Elsevier*.
- 173) Malmquist WA. 1968. Bovine viral diarrhoea-mucosal disease: Etiology, pathogenesis, and applied immunity. *J Am Vet Med Assoc.* 763–768.
- 174) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2008. 6th edition. Disponible en: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08_BVD.pdf
- 175) Martin SW, Bateman KG, Shewen PE, Rosendal S, Bohac JG, Thorburn M. 1990. A group level analysis of the associations between antibodies to seven putative pathogens and respiratory disease and weight gain in Ontario feedlot calves. *Can J Vet Res.* 54(3): 337–342.
- 176) Maurer K, Krey T, Moennig V, Thiel HJ, Rumenapf T. 2004. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 78: 1792–1799.
- 177) McInerney JP, Howe KS, Schepers JA. 1992. A framework for the economic analyses of disease in farm livestock. *Prev Vet Med.* 13:137–54.
- 178) McClurkin AW, Littledike ET, Cutlip RC, Frank GH, Coria MF, Bolin SR. 1984. Production of a cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Can J Comp Med.* 48 (2): 156-61.
- 179) Meyers G, Ege A, Fetzer C, Von Freyburg M, Elbers K, Carr V, Prentice H, Charleston B, Schürmann EM. 2007. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Prevention of Persistent Fetal Infection by a Combination of Two Mutations Affecting Erns RNase and Npro Protease. *J.*

- Viol.* 81: 3327-3338.
- 180) Meyers G, Thiel HJ. 1996. Molecular characterization of Pestiviruses. *Adv Virus Res* 47: 53–118
- 181) Meyers G, Tautz N, Becher P, Thiel HJ, Kümmerer BM. 1996. Recovery of Cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* 70: 8606-8613.
- 182) Meyers G, Tautz N, Stark R, Brownlie J, Dubovi EJ, Collett MS, et al. 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic Pestiviruses. *Virology*, 191: 368-386.
- 183) Mishra N, Pattnaik B, Vilcek S, Patil SS, Jain P, Swamy N, Bhatia S, Pradhan HK. 2004. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. *Vet. Microbiol.* 104, 207–212.
- 184) Mishra N, Rajukumar K, Pateriya A, Kumar M, Dubey P, Behera SP, Verma A, Bhardwaj P, Kulkarni DD, Vijaykrishna D, Reddy ND. 2014. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like Pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet Microbiol.* 174(1-2):239-46.
- 185) Moennig V, Liess B. 1995. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11, 477–487.
- 186) Moerman A, Straver PJ, de Jong MC, Quak, J, Baanvinger T, van Oirschot JT. 1993. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Vet. Rec.* 132, 622– 626.
- 187) Moradpour D, Penin F, Rice CM. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology* 5, 453-463
- 188) Munoz-Zanzi CA, Hietala SK, Thurmond MC, Johnson WO. 2003. Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhea virus in dairy calves. *Am J Vet Res.* 64: 358-65.
- 189) Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. 1999. *Veterinary Virology*. Third edition. Academic Press. 555-569. 629 págs.
- 190) Murray CL, Marcotrigiano J, Rice, CM. 2008. Bovine Viral Diarrhea Virus Core Is an Intrinsically Disordered Protein That Binds RNA. *Journal of Virology*, p. 1294–1304.
- 191) Nagai M, Hayashi M, Itou M, Fukutomi T, Akashi H, Kida H, Sakoda Y. 2008. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes* 36 (1), 135–139.
- 192) Nettleton PF, Entrican G. 1995. Ruminant Pestiviruses. *Br. Vet. J.* 151: 615–642.
- 193) Nettleton P., Willoughby K. *Border Disease Virus*. 2008. *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*. Pages 335-341.
- 194) Neil JD. 2013. Molecular Biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals* 41 2-7
- 195) Neill JD, Ridpath JF, Fischer N, Grundhoff A, Postel A, Becher P. 2014. Complete genome sequence of pronghorn virus, a Pestivirus. *Genome Announc.* 2(3):e00575-14.
- 196) Niskanen R, Alenius S, Larsson B, Jacobsson SO. 1991. Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. *Arch Virol.* S3:245–51.
- 197) Nobiron I, Thompson I, Browlie J, Collins M. 2003. DNA vaccination against Bovine Viral Diarrhea Virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine*, 21: 2082-92.
- 198) Nuotio L, Juvonen M, Neuvonen E, Sihvonen L, Husu-Kallio J. 1999. Prevalence

- and geographic distribution of bovine viral diarrhoea (BVD) infection in Finland 1993–1997. *Vet Microbiol.* 64:231–5.
- 199) Odeón AC, Späth EJA, Paloma EJ, Leunda MR, Fernández Sainz IJ, Pérez SE, Kaiser GG, Draghi MG, Cetrá BM, Cano A. 2001. Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, Vol. 82 N° 4:216-220.
- 200) Olafson P, MacCallum AD, Fox A. 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36: 205-213.
- 201) Otonel RA, Alfieri AF, Dezen S, Lunardi M, Headley SA, Alfieri AA. 2014. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 46(1):87-92.
- 202) Pastoret PP. 2010. Human and animal vaccine contaminations. *Biologicals*, 38: 332-334.
- 203) Paton DJ. 1995. Pestivirus Diversity. *J. Comp. Path.* 112: 215–236.
- 204) Paton DJ, Christiansen KH, Alenius S, Cranwell MP, Pritchard GC, Drew TW. 1998. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Vet Rec.* 142:385–91.
- 205) Peletto S, Zuccon F, Pitti M, Gobbi E, Marco LD, Caramelli M, Masoero L, Acutis PL. 2012. Detection and phylogenetic analysis of an atypical Pestivirus, strain IZSPLV_To. *Research in Veterinary Science*, 92 (1) 147–150 .
- 206) Pellerin C, Van den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203:260–268.
- 207) Perdrizet JA, Rebhun WC, Dubovi EJ, Donis RO. 1987. Bovine virus diarrhoea clinical syndromes in dairy herds. *Cornell Vet.* 77:46–74.
- 208) Pestova TV y Hellen CU. 1999. Internal initiation of translation of bovine viral diarrhoea virus RNA. *Virology*, 258:249–256.
- 209) Peterhans E, Jungi T W, Schweizer M. 2003. BVDV and innate immunity. *Biologicals*, 31; 107–111
- 210) Peterhans E, Schweizer M. 2013. BVDV: A Pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals*, 41; 39-51
- 211) Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M. 2010. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging Pestivirus doomed to extinction. *Vet Res.* 41:44.
- 212) Polak MP, Zmudzinski JF. 1999. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in bulls in artificial insemination centers in Poland. *Veterinary Microbiology* 64; 253±257.
- 213) Plant JW, Littlejohns IR, Gardiner AC, Vantsis JT, Huck RA. 1973, Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. *Vet Rec* 92:455.
- 214) Potgieter LN, McCracken MD, Hopkins FM, Walker RD. 1984. Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am J Vet Res.* 45(4):687-90.
- 215) Potgieter L. 1995. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North. Am. Food. An. Pract.* 11: 501-520.
- 216) Pogradichniy RM, Schnur ME, Raizman EA, Murphy DA, Negron M, Thacker LH. 2011. Isolation and Genetic Analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus from Infected Cattle in Indiana. *Veterinary Medicine International*, Volume 2011, Article ID 925910, 6 pages.
- 217) Purchio, AF, Larson R, Collet MS. 1984. A Characterization of Bovine Viral diarrhoea virus proteins. *J. Virol.* 50: 666-669.
- 218) Qu L, McMullan LK, Rice CM. 2001. Isolation and characterization of noncytopathic Pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J Virol.* 75.22: 10651-10662.
- 219) Quaipe T. 1996. Improper vaccination compounds BVD problem. *Dairy herd Manag.* 33 (10), 12-16.
- 220) Radostits OM, Littlejohns IR. 1988. New concepts in the Pathogenesis, Diagnosis and

Control of Diseases Caused by the Bovine Viral Diarrhea Virus. *Can. Vet. J.* 29: 513-528

- 221) Ramírez G, Vera V, Villamil L. 1999. Diarrea viral bovina-DVB inmunosupresión y efectos en la reproducción bovina. *El Cebú*, 32-40.
- 222) Ramsey FK, Chivers WH. 1953. Mucosal disease of cattle. *North. Am. Vet.* 34: 629-634.
- 223) Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM. 1998. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family *Flaviviridae* are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.* 72:6199–6206.
- 224) Reed MJ y Muench H. 1938. "A simple method for estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497
- 225) Reichel MP, Hill FI, Voges H. 2008. Does control of bovine viral diarrhoea infection make economic sense?, *New Zealand Veterinary Journal*, 56:2, 60-66
- 226) Renard A, Dina D, Martial JA: 1987, Vaccines and diagnostics derived from bovine viral diarrhoea virus. European Patent Application No. 86870095.6. *Publication No. 0208672*.
- 227) Ridpath JF. 2010. Bovine viral diarrhoea virus: Global status. *Vet Clin Food Anim* 26 105–121.
- 228) Ridpath J.F. 2013. Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals*, 41;14-19.
- 229) Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, 205: 66-74
- 230) Ridpath JF, Bolin SR. 1995a. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology*, 212:39–46.
- 231) Ridpath JF, Bolin SR. 1995b. – Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. *Virology*, 212 (1), 259-262.
- 232) Ridpath JF, Bolin SR. 1997. Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other Pestiviruses. *Virus Research*, Volume 50, Issue 2, Pages 237-243
- 233) Ridpath JF, Neill JD, Frey M, Landgraf JG. 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol*, 77(1–2):145–55.
- 234) Ridpath JF, Neill JD, Vilcek S, Dubovi E, Carman S. 2006. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet. Microb.* 114: 196-204.
- 235) Ridpath JF, Fulton RW, Kirkland PD, Neill JD. 2010: Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the Southwestern United States. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 184–191.
- 236) Ridpath JF, Lewis TL, Bolin SR, Berry ES. 1991. Antigenic and genomic comparison between non-cytopathic and cytopathic bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle that had spontaneous mucosal disease. *J. Gen. Virol.* 72: 725-729.
- 237) Rufenacht J, Schaller P, Audige L, Strasser M, Peterhans E. 2000. Prevalence of cattle infected with bovine viral diarrhoea virus in Switzerland. *Vet Rec* 147, 413-417.
- 238) Roeder PL, Harkness JW. 1986. BVD virus infection: Prospects for control. *Vet Rec.* 118: 143-147.
- 239) 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. *Journal of General Virology*, 89, 2114–2121.
- 240) Rossmannith W, Deinhofer M. 1998. Untersuchungen über das Vorkommen von BVD-Virusinfektionen in niederösterreichischen Milchviehbetrieben. *Dtsch Tierärztl Wschr*

- 241) Rügenapf T, Unger G, Strauss JH, Thiel HJ. 1993. Processing of the envelope glycoproteins of Pestiviruses. *J Virol.* 67.6: 3288-3294.
- 242) Sagar M, Goyal, Ridpath JF. 2008. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control.
- 243) Saldívar PVM, Posadas ME, Hernández-Ignacio J. 2009. Monitoreo serológico de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y diarrea viral bovina (DVB) en ganado de doble propósito en el municipio de Miacatlan Estado de Morelos. *Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Buiatría.* 6 agosto, Chiapas, México.
- 244) Saliki, JT; Dubovi, EJ. 2004. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20(1): 69-83.
- 245) Sandvik, T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhea virus infections in cattle. *Vet. Microb.* 64: 123-134.
- 246) Schirrmeyer H, Strebelow G, Depner K, et al., 2004. Genetic and antigenic characterization of an atypical Pestivirus isolate, a putative member of a novel Pestivirus species. *J Gen Virol.* 85(Pt 12):3647–52.
- 247) Schweizer M, Peterhans E. 1999. Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. *J Gen Virol.* 80:1147–55.
- 248) Seago J, Hilton L, Reid E, Doceul V, Jeyatheesan J, Moganeradj K, McCauley J, Charleston B, Goodbourn S. 2007. The Npro product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhea virus uses a conserved mechanism to target interferón regulatory factor-3. *J Gen Virol* 88(Pt 11):3002–6
- 249) Shimizu M, Satou K, Nishioka N, Yoshino T, Momotani E, Ishikawa Y. 1989. Serological characterization of viruses isolated from experimental mucosal disease. *Vet Microbiol.* 19: 13-21.
- 250) Silveira S, Weber MN, Mósena AC, da Silva MS, Streck A. F, Pescador CA, Flores EF, Weiblen R, Driemeier D, Ridpath JF y Canal CW. 2015. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transboundary and Emerging Diseases* doi: 10.1111/tbed.12427.
- 251) Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2010. Enfermedades de los bovinos reportadas a la Organización Mundial de la Sanidad Animal. En: <http://senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=22435&IdUrl=42675>.
- 252) Smith DR y Grotelueschen DM. 2004. Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 20 (1), 131-149.
- 253) Solís-Calderón JJ, Segura-Correa VM, Segura-Correa JC. 2005. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatán, México: Seroprevalence and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine* 72,253–262
- 254) Sopp P, Hooper LB, Clarke MC, Howard CJ, Brownlie J. 1994. Detection of bovine viral diarrhoea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes. *J Gen Virol.* 75:1189–1194.
- 255) Stalder HP, Meier P, Pfaffen G, Wageck-Canal C, Rüfenacht J, Schaller P, Bachofen C, Marti S, Vogt HR, Peterhans E. 2005. Genetic heterogeneity of Pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev Vet Med.* 72(1–2):37–41 [discussion: 215–9].
- 256) Suzan VM, Onuma M, Aguilar RE, Murakami Y. 1983. Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. *Jpn J Vet Res.* 31:125-132.
- 257) Tajima M, Frey HR, Yamato O, Maede Y, Moennig V, Scholz H, Greiser-Wilke I. 2001. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res.* 76, 31– 42.
- 258) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filpiski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- 259) Tautz N, Thiel HJ, Dubovi EJ, Meyers G. 1994. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic Pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol.* 68: 3289-3297.

- 260) Tautz N, Harada T, Kaiser A, Rinck G, Behrens S, and Thiel HJ. 1999. Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic Pestivirus replicons. *J. Virol.* 73:9422–432.
- 261) Tautz N, Elbers K, Stoll D, Meyers G, Thiel HJ. 1997. Serine protease of Pestiviruses: determination of cleavage sites. *J. Virol.* 71.7: 5415-5422.
- 262) Tews BA; Schürmann EM, Meyers G. 2009. Mutation of Cysteine 171 of Pestivirus Erns RNase Prevents Homodimer Formation and Leads to Attenuation of Classical Swine Fever Virus. *Journal of Virology*, p. 4823–4834.
- 263) Thiel HJ, Plagemann PGW, Moennig V. 1996. Pestiviruses. En: Fields, B.N. (Ed.), *Virology*, 3rd Edition. Raven, Philadelphia, PA, pp. 1059±1074.
- 264) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids. Res.* 22:4673-4680.
- 265) Thompson RG, Savan M. 1963. Studies on virus diarrhoea and mucosal disease of cattle. *Can J Comp Med Vet Sci* 27:207–214. 73:768–769.
- 266) Traven M, Alenius S, Fossum C, Larsson B. 1991. Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf." *Zentralbl Veterinarmed B.* 38.6 (): 453-462.
- 267) Toplak I, Sandvik T, Barlic-Maganja D, Grom J, Paton DJ. 2004. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Vet. Microbiol.* 99, 175–185.
- 268) Underdahl NR, Grace OD, Hoerlein AB. 1957. Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease. *Proc Soc Biol Med* 94: 795.
- 269) Vadillo S, Píriz S, Mateos E. 2002. *Manual de Microbiología Veterinaria*. España, Editorial Interamericana. Mc Graw- Hill: 731-738. 853 págs.
- 270) Valle PS, Martin SW, Tremblay R, Bateman K. 1999. Factors associated with being a bovine-virus diarrhoea (BVD) seropositive dairy herd in the Møre and Romsdal County of Norway. *Prev. Vet. Med.* 40, 165–177.
- 271) Valle P, Skjerve E, Wayne S, Larsen R, Nyberg O. 2005. Ten years of BVDV control in Norway: A cost benefits analysis. *Prev Vet Med.* 72: 189.
- 272) Van Oirschot JT. 2001. Present and future of veterinary viral vaccinology: a review. *Vet Q.* 23(3):100-8.
- 273) Van Rijn PA, van Gennip HG, Leendertse CH, Brusckke CJ, Paton DJ, Moormann RJ, van Oirschot JT. 1997. Subdivision of the Pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology* 237:337–348.
- 274) Vera V. 1999. Genética molecular del virus de la diarrea viral bovina. *Memorias: Aspectos básicos de la fisiología reproductiva y perspectivas de la biotecnología en Colombia*. Oct, 21. Villavicencio, Meta.
- 275) Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 136: 309-323.
- 276) Vilcek S, Drew TW, McGoldrick A, Paton DJ. 1999. Genetic typing of bovine Pestiviruses from England and Wales. *Vet. Microbiol.* 69, 227–237.
- 277) Vilcek, S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmannith, W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146, 99–115.
- 278) Vilcek S, Greiser-Wilke I, Durkovic B, Oritzhauser W, Deutz A, Köfer J. 2003. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria). *Veterinary Microbiology*, 285-291.
- 279) Vilcek S, Durkovic B, Kolesarova M, Greiser-Wilke I, Paton D. 2004. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet. Res.* 35, 609–615.
- 280) Vilcek S, Ridpath JF, Van Campen H, Cavender JL, Warg J. 2005. Characterization of a novel Pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res.* 108:187–193.

- 281) [Viral Zone] *Viral Zone. Pestivirus*. [actualización: 2010] SIB Swiss Institute for Bioinformatics. http://viralzone.expasy.org/all_by_species/39.html [consulta: marzo de 2016].
- 282) Wegelt A, Reimann L, Zemke J, Beer M. 2009. New insights into processing of bovine viral diarrhoea virus glycoproteins Erns and E1. *Journal of General Virology*, 90, 2462–2467.
- 283) Weiland E, Stark R, Haas B, Rümener T, Meyers G, Thiel HJ. 1990. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.* 64: 3563- 3569.
- 284) Welsh MD, Adair B M, Foster JC. 1995. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 46, 195-210.
- 285) Wentink GH, van Exsel AC, de Goey I, van Lieshout JA. 1991. Spread of bovine virus diarrhoea virus in a herd of heifer calves. *Vet. Q.* 13, 233–236.
- 286) Wiskerchen M, Belzer SK, Collett MS. 1991. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhoea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.* 65:4508–4514.
- 287) Woods RD, Kunkle RA, Ridpath JF, Bolin SR. 1999. Bovine viral diarrhoea virus isolated from fetal calf serum enhances pathogenicity of attenuated transmissible gastroenteritis virus in neonatal pigs. *J Vet Diag Invest* 11:400–407.
- 288) Wray C, Roeder PL. 1987. Effect of bovine virus diarrhoea– mucosal disease virus infection on salmonella infection in calves. *Res Vet Sci.* 42:213–218.
- 289) Xia H, Vijayaraghavan B, Belák S, Liu L. 2011. Detection and Identification of the Atypical Bovine Pestiviruses in Commercial Foetal Bovine Serum Batches, *PLoS ONE* 6(12).
- 290) Xu J, Mendez E, Caron PR, Lin C, Murcko MA, Collett MS, Rice CM. 1997. Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for Pestivirus replication. *J. Virol.* 71:5312–5322.
- 291) Xue F, Zhu YM, Li J, Zhu LC, Ren XG, Feng JK, Shi HF, Gao YR. 2010. Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China Between 2005 and 2008. *Veterinary Microbiology*, 143; 379-383.
- 292) Xue W, Blecha F, Minocha HC. 1990. Antigenic Variations in Bovine Viral Diarrhoea Viruses Detected by Monoclonal Antibodies. *J. Clin. Microb.* 28, 8: 1688-1693.
- 293) Xue W, Minocha HC. 1993. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.* 74: 73-79.
- 294) Yu H, Grassmann CW, Behrens SE. 2000. A stem-loop motif formed by the immediate 5 terminus of the bovine viral diarrhoea virus genome modulates translation as well as replication of the viral genome. *J. Virol.* 74:5825–5835.

11. Anexos

Anexo 1. Muestras de trabajo (suero)

Región: Napateco, Hidalgo			
Identificación	Edad	Sexo	Raza
Bellota	4 años	H	Suizo Americano
Chaparrita 2	4 años	H	Holstein
Pinta 2	4 años	H	Holstein
Chilindrina	4 años	H	Holstein
1813	4 años	H	Holstein
1821	4 años	H	Holstein
1818	4 años	H	Holstein
Chaparrita 1	4 años	H	Holstein
Coneja	4 años	H	Suizo Americano
1816	4 años	H	Holstein
1797	4 años	H	Holstein
Paloma	4 años	H	Holstein
Amarilla	4 años	H	Holstein
1807	4 años	H	Holstein
Uva	4 años	H	Pardo Suizo
La Café	4 años	H	Holstein
Chiva	4 años	H	Jersey
Pinta 1	4 años	H	Holstein
La Negra	4 años	H	Holstein
Tatiana	4 años	H	Jersey
Gorda	4 años	H	Suizo Americano
1816-G	4 años	H	Holstein
Pancha	4 años	H	Holstein
14	4 años	H	Holstein
13	4 años	H	Holstein
Abigail	4 años	H	Holstein
Josefina	4 años	H	Holstein
9	4 años	H	Holstein
Renga	4 años	H	Holstein
Gorda 2	4 años	H	Holstein
Pili	4 años	H	Holstein
Elefante	4 años	H	Holstein
Lucero	4 años	H	Holstein
Rufina	4 años	H	Holstein
Negra	4 años	H	Holstein
Canela	4 años	H	Holstein
Jabonera Jr	4 años	H	Holstein

10	4 años	H	Holstein
Mocha	4 años	H	Holstein
Fabiola	4 años	H	Holstein
María	4 años	H	Holstein
Alejandra	4 años	H	Holstein
Canela 2	4 años	H	Holstein
Rubí	4 años	H	Holstein
Jabonera Madre	4 años	H	Holstein
Blanca	4 años	H	Holstein
Pantracia	4 años	H	Holstein
4	4 años	H	Holstein
11	4 años	H	Holstein
Colorada	4 años	H	Holstein
Parda	4 años	H	Holstein
Renga 2	4 años	H	Holstein
7	4 años	H	Holstein
Perla	4 años	H	Holstein
15	4 años	H	Holstein
Liliana	4 años	H	Holstein

Región: Acayucan, Veracruz			
Identificación	Edad	Sexo	Raza
Amarillo 9472	4 años	H	Criolla
353	6 años	H	Criolla
Felix 2	7 años	H	Holandesa
Felix 3	7 años	H	Holandesa
A9464	10 años	H	F1
A9362	-----	-----	-----
A4134	9 años	H	F1
A9453	11 meses	H	Suiza
L2	2 años	M	Hol/ Cebú
A9366	7 años	H	F1
A9455	-----	-----	-----
M664008	9 años	H	Criolla
976	7 años	H	F1
A9410	9 meses	H	Suiza
A9360	9 años	H	Suiza
A9342	8 años	H	Criolla
A937		H	
A9495	3 años	M	Raboni
A9347	10 años	H	Criolla
A9473	5 años	H	Hol / Cebú

9352	10 años	H	F1
Felix 4	7 años	H	Holandesa
L280	3 años	M	F1
9474	8 años	H	F1
Metalico 439490	-----	-----	-----
Lomo 932	7 años	H	Criolla
Lomo 276	3 años	H	Criolla
719	3 años	H	Suiza
L225	11 años	H	Criolla
A0367	7 años	H	F1
9363	7 años	H	Suiza
M373458	9 años	H	Holstein
Amarillo 9471	6 años	H	Criolla
9358	9 años	H	Criolla
369	7 años	H	Suiza
Amarillo 9485 Lomo 2878 años		H	F1
A9431	3 años	H	Suiza
9346	9 años	H	Criolla
A9457	11 meses	H	Cebú
L442	9 meses	H	Suiza
Amarillo 390	9 años	H	Simmental
A9362	12 años	H	F1
L450	11 meses	H	Criolla
Amarillo 9476	8 años	H	Criolla
A9358	9 años	H	Criolla
A2198	10 años	H	Criolla
A9493	3 años	M	Raboni
Felix 1	7 años	H	Holandesa

Región: Victoria, Tamaulipas			
Identificación	Edad	Sexo	Raza
15	13 meses	H	Brangus rojo
19	13 meses	H	Brangus rojo
22	13 meses	H	Brangus rojo
23	14 meses	H	Brangus rojo
25	13 meses	H	Brangus rojo
30	13 meses	H	Brangus rojo
31	13 meses	H	Brangus rojo
34	13 meses	H	Brangus rojo
40	4 años	H	Brangus rojo
42	4 años	H	Brangus rojo
43	50 meses	H	Brangus rojo
44	5 años	H	Brangus rojo

45	5 años	H	Brangus rojo
48	3 años	H	Brangus rojo
50	40 meses	H	Brangus rojo
51	50 meses	H	Brangus rojo
52	3 años	H	Brangus rojo
53	42 meses	H	Brangus rojo
41	50 meses	H	Brangus rojo
3	12 meses	H	Brangus rojo
9	12 meses	H	Brangus rojo
10	12 meses	H	Brangus rojo
14	13 meses	H	Brangus rojo
21	12 meses	H	Brangus rojo
26	12 meses	H	Brangus rojo
28	12 meses	H	Brangus rojo
32	12 meses	H	Brangus rojo
2	3 meses	H	Brangus rojo
4	8 meses	H	Brangus rojo
6	10 meses	H	Brangus rojo
7	11 meses	H	Brangus rojo
8	10 meses	H	Brangus rojo
11	11 meses	H	Brangus rojo
12	10 meses	H	Brangus rojo
20	10 meses	H	Brangus rojo
24	12 meses	H	Brangus rojo
27	10 meses	H	Brangus rojo
29	10 meses	H	Brangus rojo
36	10 meses	H	Brangus rojo
37	11 meses	H	Brangus rojo
38	10 meses	H	Brangus rojo
18	13 meses	H	Brangus rojo
16	12 meses	H	Brangus rojo
1	3 meses	H	Brangus rojo
5	10 meses	H	Brangus rojo

Región: Aldama, Cascadas, Tamaulipas			
Identificación	Edad	Sexo	Raza
189	-----	-----	-----
190	-----	-----	-----
161	-----	-----	-----
118	-----	-----	-----
76	-----	-----	-----
95	-----	-----	-----
160	-----	-----	-----
113	-----	-----	-----

160	-----	-----	-----
333	18 meses	M	-----
337	18 meses	M	-----
340	8 meses	M	-----
353	14 meses	M	-----
278	13 meses	H	-----

Región: Puente de Ixtla, Morelos			
Identificación	Edad	Sexo	Raza
2036	5 años	H	Suizo americano
1968	5 años	H	Suizo americano
2018	5 años	H	Suizo americano
1955	5 años	H	Suizo americano
1967	5 años	H	Suizo americano
1959	5 años	H	Suizo americano
2014	5 años	H	Suizo americano
1984	5 años	H	Suizo americano
2208	5 años	H	Suizo americano
2035	5 años	H	Suizo americano
2003	5 años	H	Suizo americano
1954	5 años	H	Suizo americano
2012	5 años	H	Suizo americano
1994	5 años	H	Suizo americano
1962	5 años	H	Suizo americano
2008	5 años	H	Suizo americano
s/n	5 años	H	Suizo americano
2214	5 años	H	Suizo americano
2032	5 años	H	Suizo americano
1969	5 años	H	Suizo americano
2002	5 años	H	Suizo americano
1979	5 años	H	Suizo americano
2031	5 años	H	Suizo americano
1960	5 años	H	Suizo americano
1970	5 años	H	Suizo americano
1987	5 años	H	Suizo americano
2004	5 años	H	Suizo americano
1983	5 años	H	Suizo americano
2011	5 años	H	Suizo americano
1998	5 años	H	Suizo americano
1997	5 años	H	Suizo americano
2005	5 años	H	Suizo americano
1958	5 años	H	Suizo americano

1975	5 años	H	Suizo americano
1985	5 años	H	Suizo americano
2215	5 años	H	Suizo americano
1992	5 años	H	Suizo americano
1989	5 años	H	Suizo americano
2037	5 años	H	Suizo americano
1973	5 años	H	Suizo americano
2023	5 años	H	Suizo americano
1982	5 años	H	Suizo americano
2016	5 años	H	Suizo americano
2204	5 años	H	Suizo americano
1956	5 años	H	Suizo americano
1965	5 años	H	Suizo americano
2009	5 años	H	Suizo americano
1972	5 años	H	Suizo americano
2199	5 años	H	Suizo americano
2024	5 años	H	Suizo americano
1964	5 años	H	Suizo americano
2001	5 años	H	Suizo americano
1990	5 años	H	Suizo americano
1996	5 años	H	Suizo americano
2200	5 años	H	Suizo americano
2025	5 años	H	Suizo americano
1991	5 años	H	Suizo americano
2013	5 años	H	Suizo americano
2027	5 años	H	Suizo americano
1957	5 años	H	Suizo americano
1974	5 años	H	Suizo americano
1988	5 años	H	Suizo americano
1978	5 años	H	Suizo americano
2212	5 años	H	Suizo americano
2203	5 años	H	Suizo americano
2019	5 años	H	Suizo americano
2010	5 años	H	Suizo americano
1976	5 años	H	Suizo americano
2201	5 años	H	Suizo americano
2207	5 años	H	Suizo americano
2000	5 años	H	Suizo americano
2007	5 años	H	Suizo americano
1953	5 años	H	Suizo americano
1986	5 años	H	Suizo americano

1993	5 años	H	Suizo americano
------	--------	---	-----------------

Región: San Juan del Río, Queretaro			
Identificación	Edad	Sexo	Raza
125	1 año	H	Holstein
131	1 año	H	Holstein
158	4 años	H	Holstein
99	5 años	H	Holstein
112	5 años	H	Holstein
104	5 años	H	Holstein
147	4 años	H	Holstein
149	4 años	H	Holstein
176	3 años	H	Holstein
18	7 años	H	Holstein
135	4 años	H	Holstein
216	3 años	H	Holstein
185	3 años	H	Holstein
189	2 años	H	Holstein
417	1 año	H	Holstein
418	1 año	H	Holstein
70	5 años	H	Holstein
270	2 años	H	Holstein
421	1 año	H	Holstein
281	1 año	H	Holstein
291	1 año	H	Holstein
174	3 años	H	Holstein
284	1 año	H	Holstein
313	1 año	H	Holstein
121	4 años	H	Holstein
230	7 años	H	Holstein
422	1 año	H	Holstein
419	1 año	H	Holstein
278	2 años	H	Holstein
305	1 año	H	Holstein
293	1 año	H	Holstein
302	1 año	H	Holstein
289	1 año	H	Holstein
416	1 año	H	Holstein
206	2 años	H	Holstein
238	2 años	H	Holstein
187	3 años	H	Holstein
283	1 año	H	Holstein

92	5 años	H	Holstein
290	1 año	H	Holstein
73	5 años	H	Holstein
251	4 años	H	Holstein
227	2 años	H	Holstein
209	2 años	H	Holstein
224	2 años	H	Holstein
137	4 años	H	Holstein
502	2 años	H	Holstein
222	2 años	H	Holstein
275	2 años	H	Holstein
177	2 años	H	Holstein
266	2 años	H	Holstein
173	1 año	H	Holstein
268	2 años	H	Holstein
244	2 años	H	Holstein
261	2 años	H	Holstein
500	2 años	H	Holstein
171	4 años	H	Holstein
258	2 años	H	Holstein
4	7 años	H	Holstein
133	4 años	H	Holstein
510	Recién nacido		Holstein
508	Recién nacido		Holstein
509	Recién nacido		Holstein

Región: Santa Gertrudis, Saucillo Chihuahua			
Identificación	Edad	Sexo	Raza
2497	8 meses	H	Charolais
6422	8 meses	H	Charolais
663	8 meses	H	Charolais
1705	8 meses	H	Charolais
8945	8 meses	H	Charolais
685	8 meses	H	Charolais
2498	8 meses	H	Angus
687	8 meses	H	Angus
2472	8 meses	H	Charolais
611	8 meses	H	Charolais
2461	8 meses	H	Charolais
6548	8 meses	H	Charolais
6487	8 meses	H	Charolais

293	8 meses	H	Charolais
673	8 meses	H	Charolais
2121	8 meses	H	Angus
665	8 meses	H	Charolais
604	8 meses	H	Charolais
634	8 meses	H	Charolais
6427	10 meses	H	Charolais
313	8 meses	H	Charolais
2466	8 meses	H	Charolais
6525	8 meses	H	Charolais
627	8 meses	H	Charolais
5791	8 meses	H	Charolais
681	8 meses	H	Charolais
635	8 meses	H	Charolais
2116	8 meses	H	Charolais
J-135	24 meses	M	Angus
B-87	24 meses	H	Angus
K-490	24 meses	H	Angus
B-11	24 meses	M	Charolais
B-3	24 meses	M	Charolais
J-136	24 meses	M	Charolais
C-47	24 meses	M	Angus
I-37	24 meses	H	Angus
D-42	24 meses	M	Charolais
B-10	24 meses	M	Charolais
M-433	24 meses	H	Angus
6544	8 meses	M	Angus
K-7	8 meses	M	Charolais
K-10	8 meses	M	Charolais
K-4	8 meses	M	Charolais
K-8	8 meses	M	Charolais
K-11	8 meses	M	Charolais
6357	8 meses	M	Angus
K-3	8 meses	M	Angus
K-6	8 meses	M	Angus
K-2	8 meses	M	Angus
17	8 meses	M	Charolais
K-9	8 meses	M	Angus
K-1	8 meses	M	Charolais
K-10	8 meses	M	Angus
K-5	8 meses	M	Angus

649	8 meses	M	Angus
1216	8 meses	H	Angus
2475	8 meses	H	Angus
607	8 meses	H	Angus
6257	8 meses	H	Angus
6169	8 meses	H	Angus
8	8 meses	H	Charolais
S/N 1	8 meses	H	Angus
6201	8 meses	H	Angus
1658	8 meses	H	Angus
5736	8 meses	H	Angus
6166	8 meses	H	Angus
1219	8 meses	H	Angus
6442	8 meses	H	Angus
648	8 meses	H	Angus
6288	8 meses	H	Charolais
1175	8 meses	H	Angus
6439	8 meses	H	Angus
1329	8 meses	H	Angus
1660	8 meses	H	Angus
6108	8 meses	H	Angus
5747	8 meses	H	Angus
6459	8 meses	H	Angus
85	8 meses	H	Charolais
6274	8 meses	H	Charolais
661	8 meses	H	Angus
268	8 meses	H	Angus
5756	8 meses	H	Angus
268	8 meses	H	Angus
606	8 meses	H	Angus
257	8 meses	H	Angus
S/N 2	8 meses	H	Angus
435	8 meses	H	Angus
6255	8 meses	H	Angus
6559	8 meses	H	Angus
6542	8 meses	H	Angus
1795	8 meses	H	Angus
2560	8 meses	H	Angus
S/N 3	8 meses	H	Angus
394	8 meses	H	Angus
1161	8 meses	H	Angus

6366	8 meses	H	Charolais
1671	8 meses	H	Angus
6315	8 meses	H	Angus
1279	8 meses	H	Angus
S/N 4	8 meses	H	Angus
265	8 meses	H	Angus
2463	8 meses	H	Charolais
2459	8 meses	H	Charolais
6396	8 meses	H	Angus
2495	8 meses	H	Charolais
2106	8 meses	H	Angus
670	8 meses	H	Angus
3	8 meses	H	Charolais
S/N 5	8 meses	H	Angus
6314	8 meses	H	Angus
S/N 6	8 meses	H	Angus
1178	8 meses	H	Angus
1196	8 meses	H	Angus
6401	8 meses	H	Angus
404	8 meses	H	Angus
1657	8 meses	H	Angus
2451	8 meses	H	Angus
260	8 meses	H	Angus
633	8 meses	H	Angus
12	8 meses	H	Charolais
15	8 meses	H	Charolais
644	8 meses	H	Angus
6173	8 meses	H	Angus
6223	8 meses	H	Angus
5410	8 meses	H	Angus
2561	8 meses	H	Angus
1164	8 meses	H	Angus
G-25	-----	M	Charolais

H= Hembra

M= Macho

----- Sin información

Anexo 2. Muestras de trabajo (capa flogística)

Región: Napateco,Hidalgo
Identificación
Bellota
Chaparrita 2
Pinta 2
Chilindrina
1813
1821
1818
Chaparrita 1
Coneja
1816
1797
Paloma
Amarilla
1807
Uva
La Café
Chiva
Pinta 1
La Negra
Tatiana
Gorda
Pancha
14
13
Abigail
Josefina
9
Renga
Gorda 2
Pili
Elefante
Lucero
Rufina
Negra
Canela
Jabonera Jr
10
Mocha
Fabiola
María

Alejandra
Canela 2
Rubí
Jabonera Madre
Blanca
Pancracia
4
11
Colorada
Parda
Renga 2
7
Perla
15
Liliana

Región: Acayucan, Veracruz
Identificación
353
Felix 3
A9362
A4134
L2
A9366
A9455
M604008
976
A9410
A9360
A9376
A9495
A9347
9352
Felix 4
L280
Meta 439490
Lomo 276
719
A0367
9363
M373458
Amari 9471
9358
Amaril 9485
A9431

9346
Amaril 9476
L2198
Felix 1
Ama 6077
759
A9457
L442
L450
9493
9473
L225
369
A390
A9453

Región: Puente Ixtla, Morelos
Identificación
1968
2018
1955
1967
1959
2014
1984
2208
2035
2003
1954
2012
1994
1962
2008
s/n
2214
2032
1969
2002
1979
1970
1987
2004
1983
2011

1998
1997
2005
1958
1975
1985
2215
1992
1989
2037
1973
2023
1982
2016
2204
1956
1965
1972
2199
2024
1964
2001
1990
1996
2200
1991
2027
1957
1974
1988
1978
2212
2203
2019
2010
1976
2201
2000
2007
1953
1986
1993
2036

Región: San Juan del Río, Querétaro
Identificación
149
128
216
185
270
281
291
278
284
305
289
206
302
293
283
290
227
209
224
275
266
268
244
261
258
492
158
99
112
104
147
176
81
135
189
417
418
70
421
174
121
230

422
419
416
238
187
92
73
251
137
502
222
177
173
500
171
4
133
131
510
508
509
313

Región: Santa Gertrudis, Saucillo Chihuahua
Identificación
404
627
633
644
648
670
1671
1196
1212
1216
1279
1705
2116
2466
2473
2972
5410
5544
5736

5756
5947
6173
6315
6487
6542
J-135
J-136
M433
S/N 5
S/N 6

Anexo 3. Resultados de la RT-PCR a partir de muestras de suero por región

Región: Napateco, Hidalgo					
No.	Sample	VIL	HCV	Mahony	HoBi
1	Bellota	(-)	(-)	(-)	(-)
2	Chaparrita 2	(-)	(-)	(-)	(-)
3	Pinta 2	(-)	(-)	(-)	(-)
4	Chilindrina	(-)	(-)	(-)	(-)
5	1813	(-)	(-)	(-)	(-)
6	1821	(-)	(-)	(-)	(-)
7	1818	(-)	(-)	(-)	(-)
8	Chaparrita 1	(-)	(-)	(-)	(-)
9	Coneja	(-)	(-)	(-)	(-)
10	1816	(-)	(-)	(-)	(-)
11	1797	(-)	(-)	(-)	(-)
12	Paloma	(-)	(-)	(-)	(-)
13	Amarilla	(-)	(-)	(-)	(-)
14	1807	(-)	(-)	(-)	(-)
15	Uva	(-)	(-)	(-)	(-)
16	La Café	(-)	(-)	(-)	(-)
17	Chiva	(-)	(-)	(-)	(-)
18	Pinta 1	(-)	(-)	(-)	(-)
19	La Negra	(-)	(-)	(-)	(-)
20	Tatiana	(-)	(-)	(-)	(-)
21	Gorda	(-)	(-)	(-)	(-)
22	1816-G	(-)	(-)	(-)	(-)
23	Pancha	(-)	(-)	(-)	(-)
24	14	(-)	(-)	(-)	(-)
25	13	(-)	(-)	(-)	(-)
26	Abigail	(-)	(-)	(-)	(-)
27	Josefina	(-)	(-)	(-)	(-)
28	9	(-)	(-)	(-)	(-)

29	Renga	(-)	(-)	(-)	(-)
30	Gorda 2	(-)	(-)	(-)	(-)
31	Pili	(-)	(-)	(-)	(-)
32	Elefante	(-)	(-)	(-)	(-)
33	Lucero	(-)	(-)	(-)	(-)
34	Rufina	(-)	(-)	(-)	(-)
35	Negra	(-)	(-)	(-)	(-)
36	Canela	(-)	(-)	(-)	(-)
37	Jabonera Jr	(-)	(-)	(-)	(-)
38	10	(-)	(-)	(-)	(-)
39	Mocha	(-)	(-)	(-)	(-)
40	Fabiola	(-)	(-)	(-)	(-)
41	María	(-)	(-)	(-)	(-)
42	Alejandra	(-)	(-)	(-)	(-)
43	Canela 2	(-)	(-)	(-)	(-)
44	Rubí	(-)	(-)	(-)	(-)
45	Jabonera Madre	(-)	(-)	(-)	(-)
46	Blanca	(-)	(-)	(-)	(-)
47	Pancracia	(-)	(-)	(-)	(-)
48	4	(-)	(-)	(-)	(-)
49	11	(-)	(-)	(-)	(-)
50	Colorada	(-)	(-)	(-)	(-)
51	Parda	(-)	(-)	(-)	(-)
52	Renga 2	(-)	(-)	(-)	(-)
53	7	(-)	(-)	(-)	(-)
54	Perla	(-)	(-)	(-)	(-)
55	15	(-)	(-)	(-)	(-)
56	Liliana	(-)	(-)	(-)	(-)

Región: Acayucan, Veracruz					
No.	Sample	HCV	VIL	Mahony	HoBi
1	Amar. 9472	(-)	(-)	(+)	(-)
2	353	(-)	(-)	(+)	(-)
3	Felix 2	(-)	(-)	(-)	(-)
4	Felix 3	(-)	(-)	(-)	(-)
5	A9464	(-)	(-)	(-)	(-)
6	A9362	(-)	(-)	(-)	(-)
7	A4134	(-)	(-)	(-)	(-)
8	L2	(-)	(-)	(-)	(-)
9	A9366	(-)	(-)	(+)	(-)
10	A9455	(-)	(-)	(-)	(-)
11	M604008	(-)	(-)	(-)	(-)
12	976	(-)	(-)	(-)	(-)
13	A9410	(-)	(-)	(-)	(-)

14	A9360	(-)	(-)	(-)	(-)
15	A9342	(-)	(-)	(-)	(-)
16	A9376	(-)	(-)	(+)	(-)
17	A9495	(-)	(-)	(-)	(-)
18	A9347	(-)	(-)	(+)	(-)
19	9352	(-)	(-)	(-)	(-)
20	Felix 4	(-)	(-)	(+)	(-)
21	L280	(-)	(-)	(-)	(-)
22	Meta 439490	(-)	(-)	(-)	(-)
23	Lomo 932 met	(-)	(-)	(-)	(-)
24	Lomo 276	(-)	(-)	(+)	(-)
25	719	(-)	(-)	(+)	(-)
26	A0367	(-)	(-)	(-)	(-)
27	9363	(-)	(-)	(-)	(-)
28	M373458	(-)	(-)	(+)	(-)
29	Amari 9471	(-)	(-)	(-)	(-)
30	9358	(-)	(-)	(-)	(-)
31	Amaril 9485	(-)	(-)	(-)	(-)
32	A9431	(-)	(-)	(-)	(-)
33	9346	(-)	(-)	(-)	(-)
34	Amaril 9476	(-)	(-)	(-)	(-)
35	L2198	(-)	(-)	(-)	(-)
36	Felix 1	(-)	(-)	(-)	(-)
37	Ama 6077	(-)	(-)	(-)	(-)
38	759	(-)	(-)	(-)	(-)
39	A9457	(-)	(-)	(-)	(-)
40	L442	(-)	(-)	(-)	(-)
41	L450	(-)	(-)	(-)	(-)
42	9493	(-)	(-)	(-)	(-)

Región: Victoria, Tamaulipas					
No.	Sample	VIL	HCV	Mahony	HoBi
1	15	(-)	(-)	(-)	(-)
2	19	(-)	(-)	(-)	(-)
3	22	(-)	(-)	(-)	(-)
4	23	(-)	(-)	(-)	(-)
5	25	(-)	(-)	(-)	(-)
6	30	(-)	(-)	(-)	(-)
7	31	(-)	(-)	(-)	(-)
8	34	(-)	(-)	(-)	(-)
9	40	(-)	(-)	(-)	(-)
10	42	(-)	(-)	(-)	(-)
11	43	(-)	(-)	(-)	(-)
12	44	(-)	(-)	(-)	(-)

13	45	(-)	(-)	(-)	(-)
14	48	(-)	(-)	(-)	(-)
15	50	(-)	(-)	(-)	(-)
16	51	(-)	(-)	(-)	(-)
17	52	(-)	(-)	(-)	(-)
18	53	(-)	(-)	(-)	(-)
19	41	(-)	(-)	(-)	(-)
20	3	(-)	(-)	(-)	(-)
21	9	(-)	(-)	(-)	(-)
22	10	(-)	(-)	(-)	(-)
23	14	(-)	(-)	(-)	(-)
24	21	(-)	(-)	(-)	(-)
25	26	(-)	(-)	(-)	(-)
26	28	(-)	(-)	(-)	(-)
27	32	(-)	(-)	(-)	(-)
28	2	(-)	(-)	(-)	(-)
29	4	(-)	(-)	(-)	(-)
30	6	(-)	(-)	(-)	(-)
31	7	(-)	(-)	(-)	(-)
32	8	(-)	(-)	(-)	(-)
33	11	(-)	(-)	(-)	(-)
34	12	(-)	(-)	(-)	(-)
35	20	(-)	(-)	(-)	(-)
36	24	(-)	(-)	(-)	(-)
37	27	(-)	(-)	(-)	(-)
38	29	(-)	(-)	(-)	(-)
39	36	(-)	(-)	(+)	(-)
40	37	(-)	(-)	(-)	(-)
41	38	(-)	(-)	(-)	(-)

Región: Aldama Cascadas, Tamaulipas					
No.	Sample	VIL	HCV	Mahony	HoBi
1	189-T	(-)	(-)	(-)	(-)
2	190-T	(-)	(-)	(-)	(-)
3	161-T	(-)	(-)	(-)	(-)
4	118-T	(-)	(-)	(-)	(-)
5	160-T	(-)	(-)	(-)	(-)
6	1693-Q	(-)	(-)	(-)	(-)
7	1451-Q	(-)	(-)	(-)	(-)
8	985-T	(-)	(-)	(-)	(-)
9	1254-Q	(-)	(-)	(+)	(-)
10	61-Q	(-)	(-)	(-)	(-)
11	1233-Q	(-)	(-)	(-)	(-)
12	326-Q	(-)	(-)	(-)	(-)

Región: San Juan del Río, Querétero					
No.	Sample	VIL	HCV	Mahony	HoBi
1	149	(-)	(-)	(-)	(-)
2	128	(-)	(-)	(-)	(-)
3	216	(-)	(-)	(-)	(-)
4	185	(-)	(-)	(-)	(-)
5	270	(-)	(-)	(-)	(-)
6	281	(-)	(-)	(-)	(-)
7	291	(-)	(-)	(-)	(-)
8	278	(-)	(-)	(-)	(-)
9	284	(-)	(-)	(-)	(-)
10	305	(-)	(-)	(+)	(-)
11	289	(-)	(-)	(-)	(-)
12	206	(-)	(-)	(+)	(-)
13	302	(-)	(-)	(+)	(-)
14	293	(-)	(-)	(-)	(-)
15	283	(-)	(-)	(+)	(-)
16	290	(-)	(-)	(-)	(-)
17	227	(-)	(-)	(-)	(-)
18	209	(-)	(-)	(-)	(-)
19	224	(-)	(-)	(-)	(-)
20	275	(-)	(-)	(-)	(-)
21	266	(-)	(-)	(-)	(-)
22	268	(-)	(-)	(-)	(-)
23	244	(-)	(-)	(-)	(-)
24	261	(-)	(-)	(-)	(-)
25	258	(-)	(-)	(-)	(-)
26	492	(-)	(-)	(-)	(-)
27	158	(-)	(-)	(-)	(-)
28	99	(-)	(-)	(-)	(-)
29	112	(-)	(-)	(-)	(-)
30	104	(-)	(-)	(-)	(-)
31	147	(-)	(-)	(-)	(-)
32	176	(-)	(-)	(+)	(-)
33	81	(-)	(-)	(-)	(-)
34	135	(+)	(+)	(+)	(-)
35	189	(+)	(-)	(-)	(-)
36	417	(-)	(-)	(-)	(-)
37	418	(-)	(-)	(-)	(-)
38	70	(+)	(-)	(-)	(-)
39	421	(-)	(-)	(-)	(-)
40	174	(-)	(-)	(-)	(-)
41	121	(-)	(-)	(-)	(-)

42	230	(-)	(-)	(-)	(-)
43	422	(-)	(-)	(-)	(-)
44	419	(-)	(-)	(-)	(-)
45	416	(-)	(-)	(-)	(-)
46	238	(-)	(-)	(-)	(-)
47	187	(-)	(-)	(-)	(-)
48	92	(-)	(-)	(-)	(-)
49	73	(-)	(-)	(-)	(-)
50	251	(-)	(-)	(-)	(-)
51	137	(+)	(-)	(+)	(-)
52	502	(+)	(-)	(+)	(-)
53	222	(+)	(-)	(+)	(-)
54	177	(-)	(-)	(-)	(-)
55	173	(-)	(-)	(-)	(-)
56	500	(-)	(-)	(-)	(-)
57	171	(-)	(-)	(+)	(-)
58	4	(-)	(-)	(-)	(-)
59	133	(-)	(-)	(-)	(-)
60	131	(-)	(-)	(+)	(-)
61	510	(-)	(-)	(-)	(-)
62	508	(-)	(-)	(-)	(-)
63	509	(-)	(-)	(-)	(-)

Región: Puente de Ixtla, Morelos					
No.	Sample	VIL	HCV	Mahony	HoBi
1	1968	(-)	(-)	(-)	(-)
2	2018	(-)	(-)	(-)	(-)
3	1955	(-)	(-)	(-)	(-)
4	1967	(-)	(-)	(-)	(-)
5	1959	(-)	(-)	(-)	(-)
6	2014	(-)	(-)	(-)	(-)
7	1984	(-)	(-)	(-)	(-)
8	2208	(-)	(-)	(-)	(-)
9	2035	(-)	(-)	(-)	(-)
10	2003	(-)	(-)	(-)	(-)
11	1954	(-)	(-)	(-)	(-)
12	2012	(-)	(-)	(-)	(-)
13	1994	(-)	(-)	(-)	(-)
14	1962	(-)	(-)	(-)	(-)
15	2008	(-)	(-)	(-)	(-)
16	s/n	(-)	(-)	(-)	(-)
17	2214	(-)	(-)	(-)	(-)
18	2032	(-)	(-)	(-)	(-)

19	1969	(-)	(-)	(-)	(-)
20	2002	(-)	(-)	(-)	(-)
21	1979	(-)	(-)	(-)	(-)
22	2031	(-)	(-)	(-)	(-)
23	1970	(-)	(-)	(-)	(-)
24	1987	(-)	(-)	(-)	(-)
25	2004	(-)	(-)	(-)	(-)
26	1983	(-)	(-)	(-)	(-)
27	2011	(-)	(-)	(-)	(-)
28	1998	(-)	(-)	(-)	(-)
29	1997	(-)	(-)	(-)	(-)
30	2005	(-)	(-)	(-)	(-)
31	1958	(-)	(-)	(-)	(-)
32	1975	(-)	(-)	(-)	(-)
33	1985	(-)	(-)	(-)	(-)
34	2215	(-)	(-)	(-)	(-)
35	1992	(-)	(-)	(-)	(-)
36	1989	(-)	(-)	(-)	(-)
37	2037	(-)	(-)	(-)	(-)
38	1973	(-)	(-)	(-)	(-)
39	2023	(-)	(-)	(-)	(-)
40	1982	(-)	(-)	(-)	(-)
41	2016	(-)	(-)	(-)	(-)
42	2204	(-)	(-)	(-)	(-)
43	1956	(-)	(-)	(-)	(-)
44	1965	(-)	(-)	(-)	(-)
45	1972	(-)	(-)	(-)	(-)
46	2199	(-)	(-)	(-)	(-)
47	2024	(-)	(+)	(-)	(-)
48	1964	(-)	(+)	(-)	(-)
49	2001	(-)	(-)	(-)	(-)
50	1990	(-)	(-)	(-)	(-)
51	1996	(-)	(-)	(-)	(-)
52	2200	(-)	(-)	(-)	(-)
53	1991	(-)	(+)	(-)	(-)
54	2027	(-)	(+)	(-)	(-)
55	1957	(-)	(+)	(-)	(-)
56	1974	(-)	(-)	(-)	(-)
57	1988	(-)	(-)	(-)	(-)
58	1978	(-)	(-)	(-)	(-)
59	2212	(-)	(-)	(-)	(-)

60	2203	(-)	(+)	(-)	(-)
61	2019	(-)	(-)	(-)	(-)
62	2010	(-)	(-)	(-)	(-)
63	1976	(-)	(+)	(-)	(-)
64	2201	(-)	(+)	(-)	(-)
65	2000	(-)	(-)	(-)	(-)
66	2007	(-)	(-)	(+)	(-)
67	1953	(-)	(+)	(-)	(-)
68	1986	(-)	(+)	(-)	(-)
69	1993	(-)	(+)	(-)	(-)

Región: Santa Gertrudis Saucillo, Chihuahua					
No.	Sample	VIL	HCV	Mahony	HoBi
1	2497	(-)	(-)	(-)	(-)
2	6422	(-)	(-)	(-)	(-)
3	663	(-)	(-)	(-)	(-)
4	1705	(-)	(-)	(-)	(-)
5	8945	(-)	(-)	(-)	(-)
6	685	(-)	(-)	(-)	(-)
7	2498	(-)	(-)	(-)	(-)
8	687	(-)	(-)	(-)	(-)
9	2472	(-)	(-)	(-)	(-)
10	611	(-)	(-)	(+)	(-)
11	2461	(-)	(-)	(+)	(-)
12	6548	(-)	(+)	(+)	(-)
13	6487	(-)	(+)	(+)	(-)
14	293	(-)	(-)	(+)	(-)
15	673	(-)	(+)	(+)	(-)
16	2121	(-)	(+)	(-)	(-)
17	665	(-)	(+)	(+)	(-)
18	604	(-)	(+)	(-)	(-)
19	634	(-)	(-)	(-)	(-)
20	6427	(-)	(-)	(-)	(-)
21	313	(-)	(-)	(-)	(-)
22	2466	(-)	(-)	(-)	(-)
23	627	(-)	(-)	(-)	(-)
24	635	(-)	(-)	(-)	(-)
25	6544	(-)	(-)	(-)	(-)
26	K-7	(-)	(-)	(-)	(-)
27	K-10	(-)	(-)	(-)	(-)
28	K-4	(-)	(-)	(-)	(-)
29	K-8	(-)	(-)	(-)	(-)
30	6357	(-)	(-)	(-)	(-)
31	K-3	(-)	(-)	(-)	(-)

32	K-6	(-)	(-)	(-)	(-)
33	K-2	(-)	(-)	(-)	(-)
34	17	(-)	(+)	(+)	(-)
35	K-9	(-)	(+)	(-)	(-)
36	K-1	(-)	(-)	(-)	(-)
37	K-10	(-)	(-)	(-)	(-)
38	K-5	(-)	(-)	(-)	(-)
39	649	(-)	(+)	(-)	(-)
40	2475	(-)	(+)	(-)	(-)
41	607	(-)	(+)	(-)	(-)
42	6257	(-)	(-)	(+)	(-)
43	6169	(-)	(+)	(+)	(-)
44	8	(+)	(+)	(+)	(-)
45	S/N 1	(+)	(-)	(+)	(-)
46	6201	(+)	(+)	(+)	(-)
47	1658	(-)	(-)	(-)	(-)
48	5736	(-)	(-)	(-)	(-)
49	6166	(-)	(-)	(-)	(-)
50	1219	(-)	(-)	(-)	(-)
51	6442	(-)	(-)	(-)	(-)
52	648	(-)	(-)	(-)	(-)
53	1175	(-)	(-)	(-)	(-)
54	6439	(-)	(+)	(-)	(-)
55	1329	(-)	(-)	(-)	(-)
56	1660	(-)	(-)	(-)	(-)
57	6108	(+)	(-)	(+)	(-)
58	6459	(-)	(+)	(+)	(-)
59	85	(-)	(+)	(+)	(-)
60	6274	(+)	(+)	(+)	(-)
61	661	(+)	(+)	(+)	(-)
62	268	(-)	(+)	(-)	(-)
63	5756	(+)	(+)	(+)	(-)
64	606	(-)	(+)	(+)	(-)
65	257	(-)	(+)	(-)	(-)
66	S/N 2	(-)	(+)	(+)	(-)
67	435	(-)	(-)	(-)	(-)
68	6255	(-)	(-)	(-)	(-)
69	1795	(-)	(-)	(-)	(-)
70	S/N 3	(-)	(-)	(-)	(-)
71	1161	(-)	(-)	(-)	(-)
72	6366	(-)	(-)	(-)	(-)
73	1671	(-)	(-)	(-)	(-)
74	6315	(-)	(-)	(-)	(-)
75	1279	(-)	(-)	(-)	(-)

76	265	(-)	(-)	(-)	(-)
77	2463	(-)	(-)	(-)	(-)
78	2459	(-)	(-)	(-)	(-)
79	6396	(-)	(-)	(-)	(-)
80	2495	(-)	(-)	(-)	(-)
81	2106	(-)	(-)	(-)	(-)
82	670	(-)	(-)	(+)	(-)
83	S/N 5	(-)	(-)	(-)	(-)
84	6314	(-)	(-)	(-)	(-)
85	S/N 6	(-)	(-)	(-)	(-)
86	1178	(-)	(-)	(-)	(-)
87	1196	(-)	(-)	(-)	(-)
88	6401	(-)	(-)	(-)	(-)
89	404	(-)	(-)	(-)	(-)
90	1657	(+)	(-)	(-)	(-)
91	2451	(-)	(+)	(-)	(-)
92	260	(-)	(-)	(-)	(-)
93	633	(-)	(-)	(-)	(-)
94	12	(-)	(+)	(-)	(-)
95	15	(-)	(-)	(-)	(-)
96	644	(-)	(-)	(-)	(-)
97	6173	(+)	(+)	(-)	(-)
98	6223	(-)	(-)	(-)	(-)
99	5410	(-)	(-)	(-)	(-)
100	2561	(-)	(-)	(-)	(-)
101	1164	(-)	(-)	(-)	(-)
102	636	(-)	(-)	(-)	(-)
103	648	(+)	(+)	(+)	(-)
104	2181	(-)	(-)	(-)	(-)
105	2473	(-)	(-)	(-)	(-)
106	1175	(+)	(+)	(-)	(-)
107	1329	(-)	(-)	(-)	(-)
108	Arete 3	(+)	(+)	(-)	(-)
109	216	(+)	(+)	(-)	(-)
110	2	(-)	(+)	(-)	(-)
111	4	(-)	(-)	(-)	(-)
112	6098	(+)	(+)	(-)	(-)
113	6542	(+)	(-)	(-)	(-)
114	6487	(+)	(+)	(-)	(-)
115	6407	(+)	(-)	(-)	(-)
116	6201	(+)	(+)	(+)	(-)
117	6233	(-)	(-)	(-)	(-)
118	5742	(-)	(-)	(-)	(-)
119	8559	(-)	(-)	(-)	(-)

120	8944	(-)	(-)	(-)	(-)
121	J-135	(-)	(-)	(-)	(-)
122	B-87	(-)	(-)	(-)	(-)
123	K-490	(-)	(-)	(-)	(-)
124	B-11	(-)	(-)	(-)	(-)
125	B-3	(-)	(-)	(-)	(-)
126	J-136	(-)	(-)	(-)	(-)
127	C-47	(-)	(-)	(-)	(-)
128	I-37	(-)	(-)	(-)	(-)
129	D-42	(-)	(-)	(-)	(-)
130	B-10	(+)	(+)	(-)	(-)
131	M-433	(-)	(+)	(-)	(-)
132	G-25	(-)	(+)	(-)	(-)
133	681	(+)	(+)	(-)	(-)
134	2116	(-)	(-)	(-)	(-)

Anexo 4. Resultados de la RT-PCR a partir de muestras de capa flogística por región

Región: Napateco, Hidalgo					
No.	Sample	VIL	HCV	Mahony	HoBi
1	Bellota	(-)	(-)	(-)	(-)
2	Chaparrita 2	(-)	(-)	(-)	(-)
3	Pinta 2	(-)	(-)	(-)	(-)
4	Chilindrina	(-)	(-)	(-)	(-)
5	1813	(-)	(-)	(-)	(-)
6	1821	(-)	(-)	(-)	(-)
7	1818	(-)	(-)	(-)	(-)
8	Chaparrita 1	(-)	(-)	(-)	(-)
9	Coneja	(-)	(-)	(-)	(-)
10	1816	(-)	(-)	(-)	(-)
11	1797	(-)	(-)	(-)	(-)
12	Paloma	(-)	(-)	(-)	(-)
13	Amarilla	(-)	(-)	(-)	(-)
14	1807	(-)	(-)	(-)	(-)
15	Uva	(-)	(-)	(-)	(-)
16	La Café	(-)	(-)	(-)	(-)
17	Chiva	(-)	(-)	(-)	(-)
18	Pinta 1	(-)	(-)	(-)	(-)
19	La Negra	(-)	(-)	(-)	(-)
20	Tatiana	(-)	(-)	(-)	(-)
21	Gorda	(-)	(-)	(-)	(-)
22	Pancha	(-)	(-)	(-)	(-)

23	14	(-)	(-)	(-)	(-)
24	13	(-)	(-)	(-)	(-)
25	Abigail	(-)	(-)	(-)	(-)
26	Josefina	(-)	(-)	(-)	(-)
27	9	(-)	(-)	(-)	(-)
28	Renga	(-)	(-)	(-)	(-)
29	Gorda 2	(-)	(-)	(-)	(-)
30	Pili	(-)	(-)	(-)	(-)
31	Elefante	(-)	(-)	(-)	(-)
32	Lucero	(-)	(-)	(-)	(-)
33	Rufina	(-)	(-)	(-)	(-)
34	Negra	(-)	(-)	(-)	(-)
35	Canela	(-)	(-)	(-)	(-)
36	Jabonera Jr	(-)	(-)	(-)	(-)
37	10	(-)	(-)	(-)	(-)
38	Mocha	(-)	(-)	(-)	(-)
39	Fabiola	(-)	(-)	(-)	(-)
40	María	(-)	(-)	(-)	(-)
41	Alejandra	(-)	(-)	(-)	(-)
42	Canela 2	(-)	(-)	(-)	(-)
43	Rubí	(-)	(-)	(-)	(-)
44	Jabonera Madre	(-)	(-)	(-)	(-)
45	Blanca	(-)	(-)	(-)	(-)
46	Pancracia	(-)	(-)	(-)	(-)
47	4	(-)	(-)	(-)	(-)
48	11	(-)	(-)	(-)	(-)
49	Colorada	(-)	(-)	(-)	(-)
50	Parda	(-)	(-)	(-)	(-)
51	Renga 2	(-)	(-)	(-)	(-)
52	7	(-)	(-)	(-)	(-)
53	Perla	(-)	(-)	(-)	(-)
54	15	(-)	(-)	(-)	(-)
55	Liliana	(-)	(-)	(-)	(-)

Región: Acayucan, Veracruz					
No.	Sample	HCV	VIL	Mahony	HoBi
1	Amar. 9472	////////	////////	////////	////////
2	353	(-)	(-)	(-)	(-)
3	Felix 2	////////	////////	////////	////////
4	Felix 3	(-)	(-)	(-)	(-)
5	A9464	////////	////////	////////	////////

6	A9362	(-)	(-)	(-)	(-)
7	A4134	(-)	(-)	(-)	(-)
8	L2	(-)	(-)	(-)	(-)
9	A9366	(-)	(-)	(+)	(-)
10	A9455	(-)	(-)	(-)	(-)
11	M604008	(-)	(-)	(+)	(-)
12	976	(-)	(+)	(-)	(-)
13	A9410	(-)	(-)	(-)	(-)
14	A9360	(-)	(-)	(-)	(-)
15	A9342	////////	////////	////////	////////
16	A9376	(-)	(-)	(-)	(-)
17	A9495	(-)	(-)	(-)	(-)
18	A9347	(-)	(-)	(-)	(-)
19	9352	(-)	(-)	(-)	(-)
20	Felix 4	(-)	(-)	(-)	(-)
21	L280	(-)	(-)	(-)	(-)
22	Meta 439490	(-)	(-)	(-)	(-)
23	Lomo 932 met	////////	////////	////////	////////
24	Lomo 276	(-)	(-)	(-)	(-)
25	719	(-)	(-)	(-)	(-)
26	A0367	(-)	(-)	(-)	(-)
27	9363	(-)	(-)	(-)	(-)
28	M373458	(-)	(-)	(-)	(-)
29	Amari 9471	(-)	(-)	(-)	(-)
30	9358	(-)	(-)	(-)	(-)
31	Amaril 9485	(-)	(-)	(-)	(-)
32	A9431	(-)	(-)	(-)	(-)
33	9346	(-)	(-)	(-)	(-)
34	Amaril 9476	(-)	(-)	(-)	(-)
35	L2198	(-)	(-)	(-)	(-)
36	Felix 1	(-)	(-)	(-)	(-)
37	Ama 6077	(-)	(-)	(+)	(-)
38	759	(-)	(-)	(-)	(-)
39	A9457	(-)	(-)	(-)	(-)
40	L442	(-)	(-)	(-)	(-)
41	L450	(-)	(-)	(-)	(-)
42	9493	(-)	(-)	(+)	(-)
43	9473	(-)	(-)	(-)	(-)
44	L225	(-)	(-)	(-)	(-)
45	369	(-)	(-)	(-)	(-)
46	A390	(-)	(-)	(-)	(-)

47	A9453	(-)	(-)	(-)	(-)
----	-------	-----	-----	-----	-----

////////// - Muestra insuficiente para realizar la RT-PCR.

Región: San Juan del Río, Querétaro					
No.	Sample	VIL	HCV	Mahony	HoBi
1	149	(-)	(-)	(-)	(-)
2	128	(-)	(-)	(-)	(-)
3	216	(-)	(-)	(-)	(-)
4	185	(-)	(-)	(-)	(-)
5	270	(-)	(-)	(-)	(-)
6	281	(-)	(-)	(-)	(-)
7	291	(-)	(-)	(-)	(-)
8	278	(-)	(-)	(-)	(-)
9	284	(-)	(-)	(-)	(-)
10	305	(-)	(-)	(-)	(-)
11	289	(-)	(-)	(-)	(-)
12	206	(-)	(-)	(-)	(-)
13	302	(-)	(-)	(-)	(-)
14	293	(-)	(-)	(-)	(-)
15	283	(-)	(-)	(-)	(-)
16	290	(-)	(-)	(-)	(-)
17	227	(-)	(-)	(-)	(-)
18	209	(-)	(-)	(-)	(-)
19	224	(-)	(-)	(-)	(-)
20	275	(-)	(-)	(-)	(-)
21	266	(-)	(-)	(-)	(-)
22	268	(-)	(-)	(-)	(-)
23	244	(-)	(-)	(-)	(-)
24	261	(-)	(-)	(-)	(-)
25	258	(-)	(-)	(-)	(-)
26	492	(-)	(-)	(-)	(-)
27	158	(-)	(-)	(-)	(-)
28	99	(-)	(-)	(-)	(-)
29	112	(-)	(-)	(-)	(-)
30	104	(-)	(-)	(-)	(-)
31	147	(-)	(-)	(-)	(-)
32	176	(-)	(-)	(-)	(-)
33	81	(-)	(-)	(-)	(-)
34	135	(-)	(-)	(-)	(-)
35	189	(-)	(-)	(-)	(-)
36	417	(-)	(-)	(-)	(-)
37	418	(-)	(-)	(-)	(-)

38	70	(-)	(-)	(-)	(-)
39	421	(-)	(-)	(-)	(-)
40	174	(-)	(-)	(-)	(-)
41	121	(-)	(-)	(-)	(-)
42	230	(-)	(-)	(-)	(-)
43	422	(-)	(-)	(-)	(-)
44	419	(-)	(-)	(-)	(-)
45	416	(-)	(-)	(-)	(-)
46	238	(-)	(-)	(-)	(-)
47	187	(-)	(-)	(-)	(-)
48	92	(-)	(-)	(-)	(-)
49	73	(-)	(-)	(-)	(-)
50	251	(-)	(-)	(-)	(-)
51	137	(-)	(-)	(-)	(-)
52	502	(-)	(-)	(-)	(-)
53	222	(-)	(-)	(-)	(-)
54	177	(-)	(-)	(-)	(-)
55	173	(-)	(-)	(-)	(-)
56	500	(-)	(-)	(-)	(-)
57	171	(-)	(-)	(-)	(-)
58	4	(-)	(-)	(-)	(-)
59	133	(-)	(-)	(-)	(-)
60	131	(-)	(-)	(-)	(-)
61	510	(-)	(-)	(-)	(-)
62	508	(-)	(-)	(-)	(-)
63	509	(-)	(-)	(-)	(-)
64	313	(-)	(-)	(-)	(-)

Región: Puente de Ixtla, Morelos					
No.	Sample	VIL	HCV	Mahony	HoBi
1	1968	(-)	(-)	(-)	(-)
2	2018	(-)	(-)	(-)	(-)
3	1955	(-)	(-)	(-)	(-)
4	1967	(-)	(-)	(-)	(-)
5	1959	(-)	(-)	(-)	(-)
6	2014	(-)	(-)	(-)	(-)
7	1984	(-)	(-)	(-)	(-)
8	2208	(-)	(-)	(-)	(-)
9	2035	(-)	(-)	(-)	(-)
10	2003	(-)	(-)	(-)	(-)
11	1954	(-)	(-)	(-)	(-)

12	2012	(+)	(-)	(+)	(-)
13	1994	(-)	(-)	(-)	(-)
14	1962	(-)	(-)	(-)	(-)
15	2008	(-)	(-)	(-)	(-)
16	s/n	(-)	(-)	(-)	(-)
17	2214	(-)	(-)	(-)	(-)
18	2032	(-)	(-)	(-)	(-)
19	1969	(-)	(-)	(-)	(-)
20	2002	(-)	(-)	(-)	(-)
21	1979	(-)	(-)	(-)	(-)
22	1970	(-)	(-)	(-)	(-)
23	1987	(-)	(-)	(-)	(-)
24	2004	(-)	(-)	(-)	(-)
25	1983	(-)	(-)	(-)	(-)
26	2011	(-)	(-)	(-)	(-)
27	1998	(-)	(-)	(-)	(-)
28	1997	(-)	(-)	(-)	(-)
29	2005	(-)	(-)	(-)	(-)
30	1958	(-)	(-)	(-)	(-)
31	1975	(-)	(-)	(-)	(-)
32	1985	(-)	(-)	(-)	(-)
33	2215	(-)	(-)	(-)	(-)
34	1992	(-)	(-)	(-)	(-)
35	1989	(-)	(-)	(-)	(-)
36	2037	(-)	(-)	(-)	(-)
37	1973	(-)	(-)	(-)	(-)
38	2023	(-)	(-)	(-)	(-)
39	1982	(-)	(-)	(-)	(-)
40	2016	(-)	(-)	(-)	(-)
41	2204	(-)	(-)	(-)	(-)
42	1956	(-)	(-)	(-)	(-)
43	1965	(-)	(-)	(-)	(-)
44	1972	(-)	(-)	(-)	(-)
45	2199	(-)	(-)	(-)	(-)
46	2024	(-)	(-)	(-)	(-)
47	1964	(-)	(-)	(-)	(-)
48	2001	(-)	(-)	(+)	(-)
49	1990	(-)	(-)	(-)	(-)
50	1996	(-)	(-)	(-)	(-)
51	2200	(-)	(-)	(-)	(-)
52	1991	(-)	(-)	(-)	(-)

53	2027	(-)	(-)	(-)	(-)
54	1957	(-)	(-)	(-)	(-)
55	1974	(-)	(-)	(-)	(-)
56	1988	(-)	(-)	(-)	(-)
57	1978	(-)	(-)	(-)	(-)
58	2212	(-)	(-)	(-)	(-)
59	2203	(-)	(-)	(-)	(-)
60	2019	(-)	(-)	(-)	(-)
61	2010	(-)	(-)	(-)	(-)
62	1976	(-)	(-)	(-)	(-)
63	2201	(-)	(-)	(-)	(-)
64	2000	(-)	(-)	(-)	(-)
65	2007	(-)	(-)	(-)	(-)
66	1953	(-)	(-)	(-)	(-)
67	1986	(-)	(-)	(-)	(-)
68	1993	(-)	(-)	(-)	(-)
69	2036	(-)	(-)	(-)	(-)

Región: Santa Gertrudis Saucillo, Chihuahua					
No.	Sample	HCV	VIL	Mahony	HoBi
1	404	(-)	(-)	(-)	(-)
2	627	(-)	(-)	(-)	(-)
3	633	(-)	(-)	(-)	(-)
4	644	(-)	(-)	(-)	(-)
5	648	(-)	(-)	(-)	(-)
6	670	(-)	(-)	(-)	(-)
7	1671	(-)	(-)	(-)	(-)
8	1196	(-)	(-)	(-)	(-)
9	1212	(-)	(-)	(-)	(-)
10	1216	(-)	(-)	(-)	(-)
11	1279	(-)	(-)	(-)	(-)
12	1705	(-)	(-)	(-)	(-)
13	2116	(-)	(-)	(-)	(-)
14	2466	(-)	(-)	(-)	(-)
15	2473	(-)	(-)	(-)	(-)
16	2972	(-)	(-)	(-)	(-)
17	5410	(-)	(-)	(-)	(-)
18	5544	(-)	(-)	(-)	(-)
19	5736	(-)	(-)	(-)	(-)
20	5756	(-)	(-)	(-)	(-)
21	5947	(-)	(-)	(-)	(-)

22	6173	(-)	(-)	(-)	(-)
23	6315	(-)	(-)	(-)	(-)
24	6487	(-)	(-)	(-)	(-)
25	6542	(-)	(-)	(-)	(-)
26	J-135	(-)	(-)	(-)	(-)
27	J-136	(-)	(-)	(-)	(-)
28	M433	(-)	(-)	(-)	(-)
29	S/N 5	(-)	(-)	(-)	(-)
30	S/N 6	(-)	(-)	(-)	(-)