



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

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

**GENOTIPIFICACIÓN DEL ORTHOPNEUMOVIRUS BOVINO  
DE AISLAMIENTOS EN MÉXICO.**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.**

**PRESENTA:  
EUGENIA NAOMI SANTIAGO SÁNCHEZ.**

**TUTOR PRINCIPAL.  
DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA, FMVZ**

**COMITÉ TUTOR.  
DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA, FESC.  
DR. JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT, FMVZ.**

**CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2017.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 mi familia por apoyarme y quererme en todo momento. Mi madre Lety, que siempre ha estado a mi lado, te adoro mami. A mi padre José Luis, por incentivarme a ser mejor persona todos los días. A mi hermana Leslie, a pesar de ser siempre agradezco que estés a mi lado. A Rito y mi chicura por muchos años de felicidad. A mis tíos Maru, Gris, Efra, Harry, Juan, Betty, Marina y Sandra. A mis primos Ixel, Kelly, Esteban y Emi. Los quiero mucho a todos.

A Isa mi mejor amiga que me apoyado y ofrecido su amistad incondicional siempre. A Blanca y Diana que siempre están para una buena platica.

A mis amigos de veterinaria Alex, Myri, Ger, Juan, Uli y David, por apoyarme y seguir con nuestra amistad a pesar de que el camino sea diferente.

A mis amigos de vacunología por colarme a la banda, Jos, Yaya, Ninna, Lázaro, Adolfo, Luis, Quique y Silvia.

A mis compañeros y amigos de virología e inmuno, Eri, Ara, Moni, Pablo, Pepe, Alice, Ari, Glu, Tere, Lau, Lalo, Julia, Aldo, Yahel, Ale y todos los de su lab. Y también a los de Maestría, Majo ya casi.

## **Agradecimientos.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por la formación académica que he recibido.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud animal, y a los profesores que me permitieron obtener las herramientas para realizar este trabajo.

A CONACyT por la beca que obtuve para poder realizar mi maestría.

A los miembros del jurado por sus comentarios para mejorar este trabajo. A el Dr. Miguel Ángel Quiroz. A la Dra. Rocío Tirado Mendoza por hacerme más preguntas y buscar sus respuestas. A la Dra. Susana Mendoza Elvira y al Dr. José Ivan Sánchez Betancourt que además formaron parte de mi comité tutor, aportando en cada tutorial observaciones para este trabajo, mil gracias por su apoyo.

Agradezco de manera especial a la persona que me dirigió hacia este camino, la Dra. Rosa Elena Sarmiento por brindarme su apoyo como tutora y amiga. Gracias por hacerme querer aprender más cada día y que lo esencial es invisible para los ojos, como los virus por ejemplo.

A Juan Carlos, Adriana y Eduardo de Laboratorios Tornel por ayudarme en esta ultima etapa del trayecto, su ayuda fue fundamental para este trabajo. A Tere y Mario, gracias por compartir su conocimiento y siempre ofrecer su ayuda. A Gil por su apoyo en el primer año de la maestría. Y a todos mis compañeros, técnicos y académicos del laboratorio de virología e inmunología.

Al Dr. Gabriel Salgado, Susana Juárez, Dr. Adán Alvarado, Dr. Alejandro Benítez y sus alumnos por ayudarme con los muestreos.

## Resumen.

El Orthopneumovirus bovino es una de las principales causas de enfermedad respiratoria a nivel mundial, produciendo pérdidas económicas, más del 70 % del ganado exhibe una respuesta serológica positiva a la edad de 12 meses. Es un virus de ARNcs negativo que codifica para 11 proteínas. La glicoproteína G de unión al receptor es la más importante por su variabilidad antigénica y genética. Antigénicamente existe un serotipo, y cuatro subgrupos antigénicos: A,B,AB y uno sin clasificar. Genéticamente basados en dicha proteína existen seis genotipos (I-VI), se agrupan geográficamente y por fecha de aislamiento. La glicoproteína G tiene un ectodominio central conservado situado entre dos dominios tipo mucina fuertemente O-glicosilados. El ectodominio contiene cuatro cisteínas que forman dos puentes disulfuro que forman un nudo. Las mutaciones resultan en la pérdida de cuatro residuos de cisteína, la supresión de dos puentes disulfuro y una hélice. En las posiciones 177 y 180 pueden tener un efecto sobre la superficie antigénica. En las posiciones 183 y 184 pueden influir sobre la estructura. En México existe evidencia serológica, pero no hay información de los genotipos circulantes. En este trabajo se logró identificar la presencia del virus por RT-PCR. Se realizó el aislamiento viral en cultivo celular de muestras de 5 estados del país, obteniendo secuencias de G, que se usaron para la reconstrucción filogenética junto con secuencias reportadas en GenBank, determinando el genotipo III como el circulante. También se compararon las secuencias de aminoácidos, sin cambios en el nudo de cisteína, pero si en Glu 177, Leu 180, cambios en la superficie antigénica, Ser 184 en la estructura y Thr 205 en el sitio de O-glicosilación. Usado por el virus como mecanismo de evasión del sistema inmune. Esta información puede ser útil para la epidemiología molecular del virus y la inmunización correcta del ganado.

Palabras claves: Orthopneumovirus bovino, glicoproteína G, aislamiento, genotipos.

## Abstract

Bovine orthopneumovirus is the most principal cause of respiratory disease worldwide, producing economic losses. More than 70% of calves exhibit a positive serological response at the age 12 months, is a RNA virus it encoded for 11 proteins. The receptor binding glycoprotein G is the most important for its antigenic and genetic variability. Antigenically exist one serotype and four antigenic subgroups: A, B, AB and untyped. Genetically exist six genotypes (I-VI) based on this protein, grouped geographically and for the isolation date. G-glycoprotein has a conserved central ectodomain located among two mucin-like domains heavily O-glycosylated. The ectodomain contains four cysteines that make two disulfide gates forming a noose. Mutations result in the loss of four cysteine residues, and the suppression of two disulfide gates and one helix. At 177 and 180 positions may have an effect on the antigenic surface. 183 and 184 positions may influence the structure. In Mexico exist serological evidence, but there is no information about circulating genotypes. In this work, the presence of the virus can be identified by RT-PCR. viral isolation was performed in cell culture of samples from 5 states of the country, getting G sequences, which were used for the phylogenetic reconstruction as well as sequences reported in GenBank determining the genotype III as the circulating. Also compared the aminoacid sequences, without changes in the cysteine knot, but in Glu 177, Leu 180, changes in antigenic surface, Ser 184 in the structure and Thr 205 at the O-glycosylation site. Used by the virus as a mechanism of evasion of the immune system. This information could be useful to the virus molecular epidemiology and the correct immunization of the cattle.

Keywords: Bovine orthopneumovirus, glycoprotein G, isolation, genotypes.

## Contenido.

1. Introducción.	1
1.1. Antecedentes.	1
1.2. El virión.	2
1.3. Ciclo Replicativo.	17
1.4. Variabilidad antigénica y genética.	18
1.5. Patogenia.	22
1.6. Inmunidad.	23
1.7. Vacunación.	24
1.8. Diagnostico.	25
1.9. Epidemiología.	26
2. Justificación.	28
3. Hipótesis.	28
4. Objetivos.	29
4.1. Objetivo General.	29
4.2. Objetivos específicos.	29
5. Material y métodos.	29
5.1. Muestreo.	29
5.2. Preparación de las muestras.	30
5.3. Extracción de ácidos nucleicos.	31
5.4. RT-PCR multiplex.	31
5.5. Aislamiento viral en cultivo celular.	32
5.6. Extracción de ácidos nucleicos de los aislamientos.	34
5.7. RT-PCR para la nucleoproteína N.	34
5.8. RT-PCR anidada para la glicoproteína G.	35
5.9. Clonación de los productos de la glicoproteína G.	35
5.10. Secuenciación de la nucleoproteína N y glicoproteína G.	36
5.11. Alineamientos.	36
5.12. Reconstrucción filogenética.	36
6. Resultados.	36
6.1. Identificación de muestras positivas a virus del CRB por RT-PCR multiplex	37
6.2. Aislamiento de O. bovino en cultivo celular.	40
6.3. Amplificación de los productos RT-PCR para la nucleoproteína N.	42
6.4. Amplificación de los productos RT-PCR para la glicoproteína G.	44

6.5. Muestras para la secuenciación.	45
6.6. Reconstrucción filogenética de la nucleoproteína N en nucleótidos.	46
6.6.1. Árbol filogenético de las secuencias reportadas de GenBank para la nucleoproteína N.	46
6.6.2. Árbol filogenético de las secuencias de la nucleoproteína N obtenidas de los aislamientos.	48
6.7. Reconstrucción filogenética para la glicoproteína G en nucleótidos.	49
6.7.1. Árbol filogenético de 197 secuencias de la glicoproteína G reportadas en GenBank, incluyendo aislamientos mexicanos.	49
6.7.2. Árbol filogenético de 28 secuencias representativas de la glicoproteína G reportadas en GenBank, incluyendo aislamientos mexicanos.	51
6.8. Reconstrucción filogenética de la glicoproteína G en aminoácidos.	52
6.8.1. Árbol filogenético de 28 secuencias representativas de la glicoproteína G reportadas en GenBank, incluyendo aislamientos mexicanos a nivel de aminoácidos.	52
6.9. Análisis de la comparación entre las secuencias de aminoácidos.	53
7. Discusión.	58
8. Conclusión	61
9. Lista de abreviaturas y siglas usadas.	62
10. Índice de cuadros.	65
11. Índice de figuras.	65
12. Referencias.	67

## 1. Introducción.

### 1.1. Antecedentes.

El Orthopneumovirus bovino (O. bovino) pertenece al orden de los Mononegavirales, a la familia Pneumoviridae y al género Orthopneumovirus. Antes llamados Virus sincitial respiratorio bovino y humano, los Orthopneumovirus fueron removidos de la familia Paramyxoviridae, de la subfamilia Pneumovirinae y del género Pneumovirus en el 2016 y renombrados en el 2017 por el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV, 2017).

El Orthopneumovirus bovino fue detectado por primera vez en Japón, Bélgica y Suiza en 1967. En 1968 se determinó que el suero bovino contenía anticuerpos neutralizantes contra el O. humano, lo que sugirió que podría existir un virus similar en el ganado y fue aislado poco tiempo después en Inglaterra y Estados Unidos en 1974 y 1975 (Maclachlan *et al.*, 2011). Pertenece al Complejo Respiratorio Bovino en el cual se encuentran otros virus tales como el Alphaherpesvirus bovino 1 (antes Herpesvirus bovino 1), el Respirovirus bovino 3 (antes virus de la parainfluenza 3 bovina) y el virus de la diarrea viral bovina, que predisponen a infecciones secundarias bacterianas como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* (Knipe, 2013, Sacco *et al.*, 2014).

Es una de las principales causas de enfermedad respiratoria bovina, y afecta a todas las especies de bovinos, así como a ovejas, cabras y otros ungulados. El O. bovino se encuentra estrechamente relacionado con el O. humano (Valarcher and Taylor, 2007, Knipe, 2013). El genoma de la cepa A51908 del O. bovino tiene un 73% de identidad de nucleótidos con O. humano. Las proteínas G y SH son las menos conservadas con un 30% y 38% de identidad, respectivamente, y existe una extensa reactividad antigénica cruzada (Knipe, 2013). El O. bovino y O. humano muestran similitudes en epidemiología y aspectos clínicos de la infección, por lo cual el O. bovino puede ser usado como modelo animal para el estudio del O. humano, aunque esta limitado por el inconveniente de la naturaleza del huésped, ya que el ganado es su huésped natural (Meyer *et al.*, 2008). El O. bovino parece estar mas estrechamente relacionado con el virus caprino que con el ovino y el humano, esto se ha determinado de acuerdo a características morfológicas, serológicas y de secuencias de aminoácidos (Trudel *et al.*, 1989).

## 1.2. El virión.

El virión es pleomórfico, las partículas tienen una forma irregular esférica de 100 a 350 nm de diámetro y largos filamentos de 60 a 200 nm de diámetro por 10 micrómetros de longitud. Los filamentos pueden ser visualizados como proyecciones en la superficie de células infectadas por fluorescencia (Knipe, 2013). Está formado por una envoltura lipídica, derivada de la membrana plasmática de la célula huésped, la cual cubre una nucleocápside helicoidal que incluye un genoma ARN de cadena sencilla, sentido negativo, no segmentado, de aproximadamente 15 kb de longitud (Bidokhti *et al.*, 2012). El ARN genómico es la plantilla para la replicación y transcripción.

En la transcripción, 10 genes se transcriben del ARN genómico de manera secuencial en 10 ARNm desde el extremo 3' en un gradiente de transcripción polar, esto quiere decir que los genes del extremo 3' se transcriben con más frecuencia que los que se encuentran en el extremo 5' y se traducen en 11 proteínas como se muestra en la figura 1 (Valarcher and Taylor, 2007, Collins and Wertz, 1983).

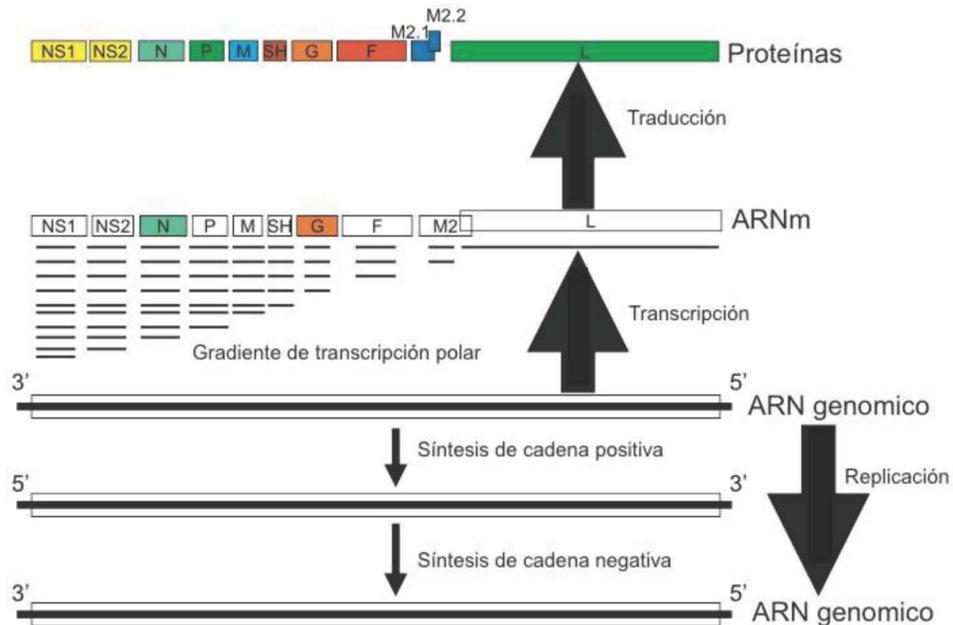


Figura 1. Transcripción, traducción y replicación del O. bovis. Modificada al español de Valarcher *et al.*, 2007.

Estas proteínas se distribuyen en el virión como se observa en la figura 2. En la superficie de la envoltura se encuentran 3 glicoproteínas transmembranales: la glicoproteína G, la proteína de fusión F y una pequeña proteína hidrófoba SH. Las glicoproteínas virales están presentes como homooligómeros transmembranales que se visualizan como proyecciones superficiales cortas (11 a 20 nm) muy próximas (intervalos de 6 a 10 nm). Además, en la superficie interna de la envoltura se encuentra la proteína de matriz M que no está glicosilada. La proteína M2-1 o factor anti-terminación de la transcripción, y M2-2 proteína reguladora del ARN, estas 2 proteínas son sintetizadas por una superposición transcripcional entre M2 y L. La nucleocápside se constituye por la nucleoproteína N, la fosfoproteína P y la proteína L o ARN polimerasa dependiente de ARN viral. Además el virión cuenta con dos proteínas no estructurales NS1 y NS2, características de los Orthopneumovirus (Knipe, 2013, Valarcher and Taylor, 2007).

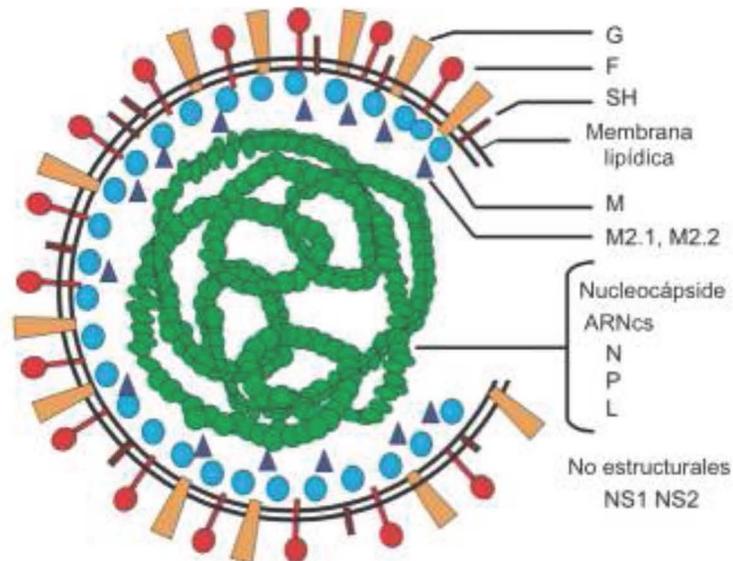


Figura 2. Esquema del Orthopneumovirus bovino. Modificada al español de Valarcher *et al.*, 2007.

El mapa genético del O. humano muy similar al del bovino como se muestra en la figura 3. Tanto en viriones como intracelularmente, el genoma viral está estrecha y completamente ligado por la proteína N para constituir la nucleocápside resistente a RNasas, típico de los *Mononegavirales*. Esta estrecha encapsidación probablemente protege el genoma, el cual carece de características estabilizadoras de CAP y poliadenilación (Knipe, 2013).

La transcripción de O. humano es el modelo general de los *Mononegavirales*, implicando la iniciación en un único promotor 3' y un mecanismo secuencial de inicio-parada-reinicio guiado por las señales Gene-Start (GS) y Gene-End (GE) (Kuo *et al.*, 1996). Cada gen comienza con una señal de transcripción de 9 nucleótidos altamente conservados (GS) y termina con una señal moderadamente conservada de 12 a 13 nucleótidos en el extremo del gen (GE) (Kuo *et al.*, 1996, Harmon *et al.*, 2001). Los primeros nueve genes son separados por una región intergenica que varía en una longitud de 1 a 58 nucleótidos (Moudy *et al.*, 2004). Los últimos 2 genes, M y L, se superponen por 68 nucleótidos (Collins and Wertz, 1983). Los extremos de inicio 3' y termino 5' del genoma consisten en regiones extragénicas cortas, de 44 y 155 nucleótidos respectivamente (Knipe, 2013).

Los ARNm contienen una estructura de CAP y son poliadenilados por copia reiterativa de un U en el tramo de la señal de termino (GE) (Barik, 1993). Cada ARNm codifica una única proteína excepto M2, que tiene marcos de lectura abiertos (ORFs) para las proteínas M2-1 y M2-2. El ORF de M2-1 es localizado en la parte dirección 3' de el ARNm, mientras que el ORF de M2-2 está localizado dirección 5' y se superpone por 32 nucleótidos. La traducción del ORF de M2-2 dirección 5', depende de la reiniciación de los ribosomas que salen de la dirección 3' del ORF de M2-1 (Gould and Easton, 2005). La señal GE de M2 dentro del gen L provoca la terminación prematura del 90% de los transcritos del gen L, produciendo un ARN poliadenilado de 68 nucleótidos que no parece codificar una proteína y no se sabe que tenga ningún significado adicional (Collins *et al.*, 1987). La síntesis de longitud completa del ARNm de L depende de la lectura de la polimerasa a través de la señal GE de M2 (Harmon *et al.*, 2001). La superposición de estos genes no parece tener ningún beneficio para el virus, puede ser un arreglo accidental que puede tolerarse (Knipe, 2013).

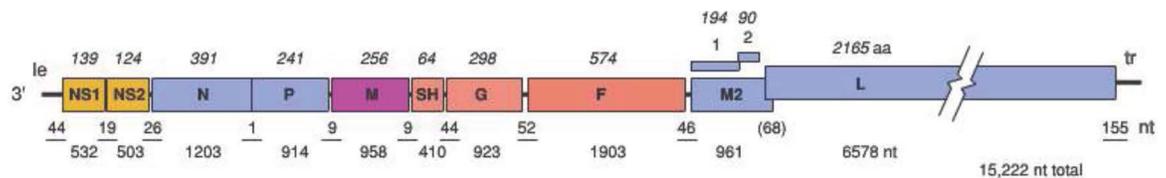


Figura 3. Mapa genético del Orthopneumovirus humano. Tomada de Knipe *et al.*, 2013.

En la replicación la polimerasa ignora las señales GS y GE, y produce una copia completa de sentido positivo del genoma viral que se denomina antígenoma. El antígenoma sirve como molde para hacer genomas virales, como se muestra en la figura 1 (Valarcher and Taylor, 2007, Knipe, 2013).

En el cuadro 1, se muestran las características principales de las proteínas del O. bovino (Meyer *et al.*, 2008, Valarcher and Taylor, 2007, Knipe, 2013).

Proteína	Tamaño (AA)	%identidad con HRSV	Mr (kDa)	Funciones
NS1	136	69	13.8	Inhibición y resistencia a IFN $\alpha/\beta$
NS2	124	84	14.5	Inhibición y resistencia a IFN $\alpha/\beta$
N	391	93	45	Se liga al ARN genómico y antígenómico para formar la nucleocápside resistente a RNAsa.
P	241	81	33	Chaperona y cofactor de la polimerasa
M	256	89	25	Ensamble del virión
SH	73	38-44	7.5-60	Posible función anti apoptotica
G	257	30	90	Unión
F	574	81	70	Fusión de membrana
M2-1	186	80	22	Factor anti-terminación de transcripción
M2-2	95	43	11	Regula ARN
L	2161	84	250	ARN polimerasa dependiente del ARN

Cuadro 1. Proteínas del BRSV.

**Proteínas NS1 Y NS2.** Las proteínas no estructurales NS1 y NS2, son únicas para el género Orthopneumovirus, las distingue de los demás Mononegavirales (Schlender *et al.*, 2000). Los genes de NS1 y NS2 tienen una longitud de 524 y 489 nucleótidos con marcos de lectura abiertos únicos, codificando polipéptidos de 136 y 124 aminoácidos, respectivamente (Pastey and Samal, 1995). Los genes que codifican estas dos proteínas se transcriben abundantemente en células infectadas (Evans *et al.*, 1996). Estas proteínas no son esenciales para la replicación del virus *in vitro* (Buchholz *et al.*, 1999) aunque durante la replicación del O. bovino carencia de una u otra de estas proteínas en cultivo celular atenúa el virus (Jin *et al.*, 2000).

Se ha informado que NS1 de O. humano esta asociada con la proteína M, mientras que la proteína NS2 no muestra ninguna asociación detectable con proteínas estructurales, lo que indica funciones distintas de NS1 y NS2 (Evans *et al.*, 1996). Se sugiere que NS1 es un fuerte inhibidor de la transcripción y replicación de ARN viral, genómico y antígenómico (Atreya *et al.*, 1998). Esto puede ser un mecanismo viral para prevenir la síntesis excesiva de ARN y evitar la acumulación de ARN genómico / antígenómico desnudo y la formación de ARNdc, que de otro modo activaría las moléculas de reconocimiento de patrón RIG-I / MDA5 / PKR (Knipe, 2013) para activar una respuesta de IFN protectora. La proteína NS2 se localiza junto a las proteínas P y N en las células infectadas. También parece ser un inhibidor transcripcional, pero a un nivel inferior a la proteína NS1.

**Proteína SH.** La proteína pequeña hidrófoba, es una proteína de transmembrana que se encuentra anclada por una secuencia hidrófoba de señal de anclaje, cerca del extremo N-terminal, con el extremo C-terminal orientado extracelularmente (Knipe, 2013). Es una proteína corta de 81 aminoácidos, varía hasta un 13% entre los diferentes aislados de O. bovino y no es esencial para la replicación del virus *in vitro* o *in vivo* (Valarcher and Taylor, 2007).

Existen pruebas de que la proteína SH puede desempeñar un papel en la fusión de células mediadas por virus mediante la interacción con la proteína F (Heminway *et al.*, 1994, Feldman *et al.*, 2001).

También hay evidencia de que tiene propiedades de una viroporina, que son pequeñas proteínas que modifican la permeabilidad y pueden desempeñar un papel en la gemación y reducir la apoptosis, y parece inhibir la señalización de factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Pornillos *et al.*, 2002).

**Proteína F.** Es la proteína de fusión es una proteína de transmembrana tipo I de 1,899 nucleótidos de longitud y contiene un ORF que codifica un polipéptido de 574 aminoácidos (Lerch *et al.*, 1991), está altamente conservada (>95%) entre diferentes cepas de O. bovino (Pastey and Samal, 1993). El análisis de la secuencia parcial de diferentes aislamientos ha demostrado una variación de aminoácidos y nucleótidos de 0,8% y 1,8% respectivamente (Valarcher *et al.*, 2000).

Se sintetiza como un precursor inactivo (F0), que se activa por escisión proteolítica por furina o una endoproteasa celular de tipo furina, es una modificación post-traducciona, en el complejo trans-golgi durante el transporte a la superficie celular para producir dos subunidades F2 en N-terminal y F1 en C-terminal unidas por disulfuro NH<sub>2</sub>-F2-F1-COOH (Collins and Mottet, 1991).

Las proteínas F de los Orthopneumovirus son únicas por tener dos sitios de escisión y pueden dirigir una fusión eficiente independiente de otras proteínas virales. La escisión de F0 libera un péptido pequeño de 27 aminoácidos (p27) situado originalmente entre los dos sitios de escisión. El primer sitio se encuentra al inicio de p27, con escisión en el residuo 109, contiene la secuencia de cuatro residuos de Arg-Ala-Arg-Arg (RARR). El segundo sitio que se encuentra al inicio del péptido de fusión con escisión en el residuo 136, contiene la secuencia de seis residuos de Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Arg (KKRKRR). Por lo tanto, ambos sitios contienen el motivo de escisión de furina (Arg-X-Arg/Lys-Arg) (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2001). Además p27 se convierte en viroquinina un péptido bioactivo de la familia de las taquiquininas, que se procesa y se libera de células infectadas para inducir la contracción del músculo liso, actividades proinflamatorias e inmunomoduladoras (Zimmer *et al.*, 2003). Por lo tanto, p27 tiene el potencial de aumentar la enfermedad viral por los efectos sobre la contracción del músculo liso y la inflamación pulmonar (Valarcher *et al.*, 2006).

Hay tres dominios hidrófobos en el polipéptido F, que se muestran en la figura 4. En el extremo N-terminal de la subunidad F2 se encuentra el péptido señal. En la subunidad F1, se encuentran el péptido de fusión situado en el extremo N-terminal que se inserta directamente en la membrana diana para iniciar la fusión, y una región transmembrana situada cerca del extremo C-terminal. La subunidad F1 también contiene dos áreas de repeticiones de heptad HRA y HRB (motivo estructural que consiste en un patrón de repetición de siete aminoácidos) que se asocian durante la fusión, impulsando un cambio conformacional que lleva a las membranas víricas y celulares a aproximarse (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2001).

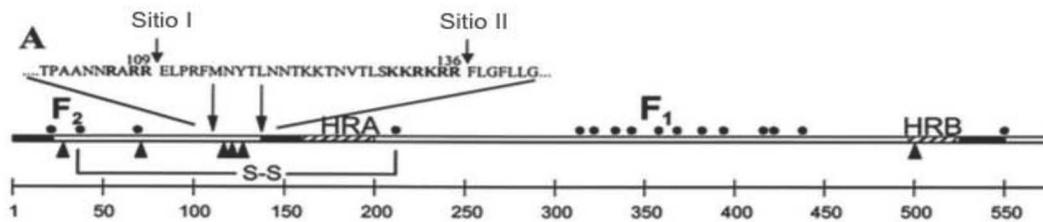


Figura 4. Esquemización de la proteína de fusión. Modificada al español de González-Reyes *et al.*, 2001.

En la figura 4 se muestran los dos sitios de escisión en la proteína F, los círculos negros indican los residuos de cisteína, los triángulos los sitios potenciales de glicosilación, las regiones hidrofóbicas con un cuadro negro, los cuadros con rayas las secuencias repetidas de heptad y las flechas los dos sitios de escisión por las proteasas tipo furina. Se inserta una secuencia parcial de aminoácidos de la proteína F en la que están indicados los motivos de secuencia de furina (negrita) y los sitios de escisión I y II. La proteína F, media la unión del virus a las células, recientes hallazgos sugieren que esta también desempeña un papel importante en la unión viral que implica la interacción con la proteína celular nucleolina (Tayyari *et al.*, 2011).

En la infección, la proteína F puede mediar la fusión de las membranas celulares entre las células infectadas y no infectadas que dan lugar a sincitios o células gigantes multinucleadas. Estudios demuestran que cuando la secuencia RARR cambia, la escisión se evita y no hay formación de sincitios. Se piensa que el péptido de fusión inicia el proceso de fusión con la membrana del huésped por lo que el sitio de escisión es importante para la patogenicidad del virus. Los virus con un motivo de división monobásico en sus proteínas de fusión normalmente causan infecciones localizadas y no pueden propagarse a diferentes órganos o tejidos (Zimmer *et al.*, 2001).

Es una proteína indispensable para la replicación del virus, un mutante de delección que contiene la subunidad F1 pero que carece de F2 y la mayor parte de p27 se replicó en cultivo celular eficientemente como el virus completo, lo que indica que este dominio no es esencial para la maduración e infectividad del virus (Zimmer *et al.*, 2002). Sin embargo la subunidad F2 es un determinante de la especificidad de especie, facilita la identificación de receptores de virus y puede permitir el desarrollo de reactivos que interfieran la entrada del virus (Schlender *et al.*, 2003).

La proteína F induce anticuerpos neutralizantes y confiere resistencia a la infección por O. bovino (Taylor *et al.*, 1992), entre los virus O. humano y O. bovino, tienen cierta reactividad antigénica cruzada (Lerch *et al.*, 1991).

**Glicoproteína G.** Es la proteína de unión al receptor, se identificó mediante experimentos en los que la unión se bloqueó con anticuerpos anti-G específicos (Levine *et al.*, 1987) tiene una longitud de 835 nucleótidos y un ORF que codifica para un polipéptido de 257 a 263 aminoácidos, dependiendo del aislamiento. Con un 90-97% y 84-95% de identidad de nucleótidos y de aminoácidos respectivamente entre cepas bovinas (Mallipeddi and Samal, 1993). Es una glicoproteína de transmembrana tipo II y con un dominio de señal/anclaje hidrofóbica entre los residuos de aminoácidos 38 y 66 cerca del extremo N terminal y los dos tercios C-terminales orientados hacia el espacio extracelular (Wertz *et al.*, 1985).

La proteína G se sintetiza en dos formas maduras. Una forma anclada/asociada a la membrana del virión (Gv) de 88 y 90 kDa, y una forma soluble/secretada al medio (Gs) mas pequeña de 82 y 72 kDa (Hendricks *et al.*, 1987, Hendricks *et al.*, 1988). Las cuales se producen de una traducción primaria distinta de una sola especie de ARNm por iniciación en cualquiera de dos AUG, la forma secretada se produce por iniciación de la traducción en el segundo AUG, en el codón 48 del ORF, que se encuentra dentro de la secuencia de señal/anclaje. Esta forma truncada es cortada por proteólisis, eliminando el resto de la señal/ancla y creando un nuevo extremo N-terminal en Asn-66 para la forma final secretada (Roberts *et al.*, 1994).

Se ha propuesto que la forma secretada aparece como monómero y podría actuar como señuelo al unirse a anticuerpos neutralizantes. Una de cada seis moléculas de G en cultivos celulares a las 24 horas postinfección corresponden a Gs, siendo evidente a las 6 horas postinfección y debido a su rápida secreción representa alrededor del 80% de la proteína liberada, el resto corresponde a Gv siendo evidente hasta 12 horas después de la infección, esto coincide con el periodo eclipse del virus de 12 horas. Por lo tanto, la proteína Gs se desprende, al menos en parte, de células infectadas intactas y antes de la aparición del virus de la progenie (Hendricks *et al.*, 1988).

La proteína G aparece como un trímero en la superficie del virión, ensambla en el retículo endoplásmico y contiene varias regiones plegadas independientemente, en las que se forman un ectodominio que consta de una región hidrofóbica central conservada situada entre dos grandes dominios que son altamente divergentes entre cepas (Langedijk *et al.*, 1996). Estos dos dominios tienen una estructura tipo mucina, debido al alto contenido de residuos de serina, treonina y prolina, (mas de 75 residuos), estos motivos están fuertemente O-glicosilados (Johnson *et al.*, 1987) y probablemente adoptan una conformación rígida y extendida, permaneciendo su integridad a pesar de la variabilidad genética, siempre y cuando el contenido de Ser, Thr y Pro permanezca y soporte la rigidez. Una posibilidad es que facilite al virus penetrar en la mucosa protectora que recubre el epitelio respiratorio (Langedijk *et al.*, 1996). Los azúcares ligados a O se añaden en el compartimiento trans-Golgi. Se sugiere que la cantidad de carbohidrato es alta, de aproximadamente 60% de su peso, 20% es carbohidrato unido a N y 80% es carbohidrato unido a C (Wertz *et al.*, 1989). La presencia de una envoltura de azúcares especificados por el huésped podría proteger a la proteína G del reconocimiento inmunológico y podría interferir con el procesamiento y la presentación del antígeno (Knipe, 2013).

La proteína G se une principalmente a través de glicosaminoglicanos (GAG) en la superficie celular, un potencial sitio de unión, después del dominio central conservado (Feldman *et al.*, 1999, Hallak *et al.*, 2000). Los GAG son cadenas largas no ramificadas de subunidades disacáridas repetidas que forman parte del glicocálix presente en la superficie de las membranas celulares. El tipo de GAG que parece más importante para la infección es el heparán sulfato (Krusat and Streckert, 1997). La escisión del dominio C-terminal de G resultó en un virus que se unía de manera menos eficiente a los GAG y tenía una infectividad reducida en cultivos HAE, lo que sugiere que este dominio es importante para la función de unión de G (Kwilas *et al.*, 2009). El papel de la proteína G se limita a facilitar la infección de una manera no específica de la especie (Schlender *et al.*, 2003).

En la figura 5, se muestra un esquema de la proteína G, en la cual se muestran los extremos N y C-terminal. La primera y segunda región tipo mucina. La región central conservada y el nudo de cisteína con sus dos puentes disulfuro.

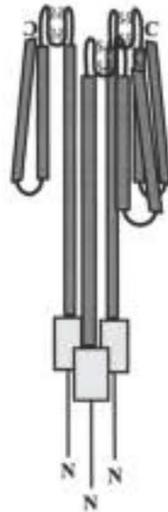


Figura 5. Esquema de la proteína G. Tomada de Melero *et al.*, 1997.

El ectodominio central conservado, incluye un segmento de 13 residuos conservados (Teng and Collins, 2002), así como un segmento que contiene cuatro residuos de cisteína conservados, en las posiciones 173, 176, 182 y 186 que forman dos puentes disulfuro entre Cys-173 y Cys-186 y entre Cys-176 y Cys-182, para crear un nudo de cistina (Langedijk *et al.*, 1996) como se observa en la figura 6. El epítipo principal de esta región se localiza en la punta del bucle, este epítipo parece ser inmunodominante (Langedijk *et al.*, 1997). El sitio entre Cys-176 y Cys-182 es importante para la unión de anticuerpos y a pesar de que existen diferencias entre las secuencias de cepas humanas (CSNNPTC) y bovinas (CEGNPAC) de este sitio, sigue presente, esto puede ser posible por la homología estructural. Cys176 es el residuo más esencial para la unión de anticuerpos que cualquier otro en el epítipo (Langedijk *et al.*, 1996).

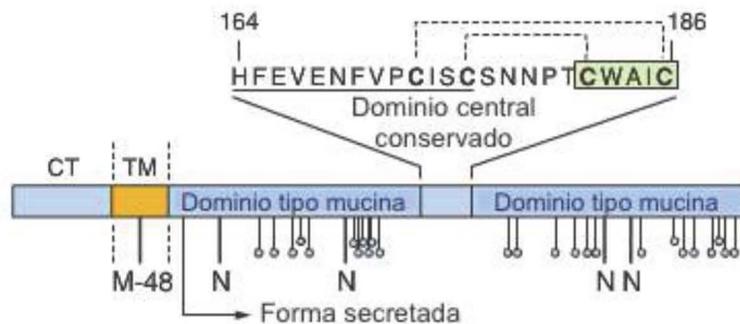


Figura 6. Segmentos de la glicoproteína G del Orthopneumovirus humano. Modificada al español de Knipe *et al.*, 2013.

La región rica en cisteína tiene homología con un motivo quimiocina (CXC3), las quimiocinas son proteínas quimioatrayentes, tienen funciones en la inmunidad y la activación de células T, así como del sistema inmune innato. Una secuencia limitada Cys-182 y Cys-186 está relacionada con la región de quimiocina CX3C llamada fractalina, lo que puede facilitar la infección al interactuar con el receptor de CX3C, CX3CR1 y la inducción de la quimiotaxis leucocitaria (Tripp *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la interacción de la proteína G con CX3CR1 y la inducción de las proteínas surfactantes pulmonares (SP-A y SP-D) son responsables de episodios de apnea (Tripp *et al.*, 2003). También puede interactuar con anexina II (Krusat and Streckert, 1997) y L-selectina (CD62L) un receptor de adhesión específico de leucocitos (Malhotra *et al.*, 2003).

**Proteína M.** Es la proteína de matriz, no glicosilada y tiene una longitud de 938 nucleótidos y codifica para un polipéptido de 256 aminoácidos (Alansari and Potgieter, 1994) y se encuentra en la superficie interna de la envoltura viral (Valarcher and Taylor, 2007). Desempeña dos funciones típicas de Mononegavirales: la primera ayuda a organizar los componentes del virión en la membrana de plasma para brotar (Takimoto and Portner, 2004) y la segunda puede silenciar la síntesis de ARN viral en preparación para el ensamble en la partícula del virus (Ghildyal *et al.*, 2003).

Una estructura cristalizada para la proteína M de O. humano reveló un monómero que se organiza en dominios N-terminales compactos (residuos 1 a 126) y C-terminales (residuos 140-255) unidos por 13 residuos. Se encontró que la superficie de M contenía una gran área cargada positivamente que se extiende a través de los dos dominios y el enlazador y puede mediar la asociación con la membrana cargada negativamente así como con las nucleocápsides. La comparación de la secuencia de M con otros miembros de su familia muestra que las regiones de divergencia corresponden a bucles expuestos superficiales, encontrándose la mayoría de las diferencias específicas de especies virales en el dominio N-terminal (Money *et al.*, 2009).

**Nucleoproteína N.** Tiene una longitud de 1,196 nucleótidos con un único marco de lectura abierto y el polipéptido es de 391 aminoácidos. La variación entre diferentes aislamientos O. bovino es de 1,5% en nucleótidos y 0,7% en aminoácidos.

Los resultados indican que los genes N tanto para el virus bovino como para el humano están altamente conservados (Samal *et al.*, 1991). La relación de secuencia con otros Mononegavirales se limita a varios segmentos conservados situados hacia el extremo C-terminal (Tawar *et al.*, 2009).

La proteína N junto con las proteínas P, L y M2-1 forman el complejo ribonucleoproteico. La proteína N es un elemento principal de la nucleocápside, se une estrechamente a lo largo de toda la longitud del ARN genómico y del ARN antígenómico a partir de nucleocápsides separadas resistentes a RNasas que son plantillas para la síntesis de ARN (Cowton *et al.*, 2006). Desempeña un papel en la transición entre la transcripción y las fases de replicación del ARN viral.

Está presente en grandes cantidades en el virión y en las células infectadas y tiene varias funciones. Estudios en terneros han demostrado que la proteína N es un antígeno protector importante del O. bovino (Taylor *et al.*, 1997), esta proteína es reconocida por CD8+ y células T específicos bovinos, la protección inducida por esta proteína puede ser mediada por células T citotóxicas (Gaddum *et al.*, 2003).

**Fosfoproteína P.** Tiene una longitud de 860 nucleótidos, con un ORF de 723 nucleótidos que codifica un péptido de 241 aminoácidos, tiene un 97% de identidad a nivel de nucleótidos y aminoácidos de los ARNm de P entre cepas bovinas y humanas, tiene un dominio hipervariable y se extiende desde el residuo 59 hasta el residuo 93 en todas las cepas, flanqueado por dos dominios conservados, y un segundo pero más corto dominio divergente que se extiende desde el residuo 213 a 231, en el dominio divergente, existe muy poca identidad entre O. bovino y O. humano tanto en el nivel de nucleótidos como en aminoácidos, pero existe un alto grado de identidad entre cepas de O. bovino (95,1% en nucleótidos y 88-89% a nivel proteico) (Alansari and Potgieter, 1994, Mallipeddi and Samal, 1992).

La proteína P del O. bovino ha demostrado ser altamente fosforilada (Mallipeddi *et al.*, 1990), como se refleja en la alta proporción de residuos de serina y treonina (17-8%).

En el residuo 34, hay un sitio de fosforilación potencial adicional en *O. bovino* en comparación con *O. humano* (subgrupos A y B), mientras que el sitio potencial en el residuo 92 de *O. humano* está ausente de *O. bovino*. Los sitios potenciales de fosforilación en los residuos 219 y 224 faltan en *O. bovino* (cepa A51908) y subgrupo A de *O. humano* (cepa A2), mientras que están presentes en el subgrupo B de *O. humano* (cepa 18537) (Mallipeddi and Samal, 1992).

Muchas de las actividades de P parecen estar dirigidas por fosforilación dinámica y desfosforilación de P. La fosforilación se controla mediante la acción coordinada de dos enzimas celulares: una quinasa (GSK-3)  $\beta$  glucosa sintetasa quinasa y (PP2A) proteína fosfatasa 2A (Asenjo *et al.*, 2008). La proteína P se modifica mediante la adición de grupos fosfato con diferentes velocidades de renovación, detectadas en presencia (baja) o en ausencia (intermedia y alta) de las actividades de fosfatasa celular PP2A y PP1. P contiene de 10 a 12 sitios fosfato, con sitios que exhiben diferentes tasas de renovación: el dominio C-terminal contiene fosfatos de baja renovación y representa la mayor parte del fosfato total (Sanchez-Seco *et al.*, 1995), el dominio medio contiene fosfatos intermedios (Navarro *et al.*, 1991), y el dominio N-terminal contiene fosfatos de alta renovación (Asenjo *et al.*, 2005).

La proteína P es un adaptador multifuncional que ayuda a mediar las interacciones entre los componentes del complejo nucleocápside/polimerasa (Collins *et al.*, 1996). Parece actuar como una chaperona para el N soluble. Opera como un homotetramero estable formado a través de un dominio de multimerización en el centro de la molécula. La región C-terminal del tetrámero P interactúa con la proteína N en la nucleocápside uniéndola a una bolsa hidrófoba rodeada por residuos cargados positivamente formados a partir de segmentos discontinuos dentro de los aa 46-151 de la proteína N, estructura distinta de la de otros miembros de los Mononegavirales (Knipe, 2013).

Está implicada como un factor de regulación para la transcripción viral y la replicación. La fosforilación regula la participación de M2-1 en la transcripción viral, P se une a las proteínas L y M2-1 y ayuda a mediar sus interacciones con la nucleocápside (Asenjo *et al.*, 2006).

P soluble se une también a los monómeros libres de la proteína N probablemente a través del dominio N-terminal de P y proporciona a N a los genomas/antigenomas nacientes durante la replicación del ARN. P impide así que N se autoagregue o se una a ARN no viral. P es un co-factor esencial de la polimerasa.

Puede contener cambios conformacionales que ayudan a la polimerasa a acceder a la plantilla de ARN y parece ser necesaria para el alargamiento de la cadena por la polimerasa viral (Dupuy *et al.*, 1999, Knipe, 2013). También parece tener un papel en la disociación de la proteína M de la nucleocápside durante el revestimiento para iniciar la infección (Asenjo *et al.*, 2008).

**Proteína L.** Es una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), el gen de la polimerasa L de O. bovino tiene una longitud de 6,573 nt y la proteína un tamaño de 2162 aminoácidos (Yunus *et al.*, 1998), esta proteína es responsable de la síntesis de RNA genómico (actividad replicasa) y ARNm subgenómico (actividad transcriptasa) (Liuzzi *et al.*, 2005). La polimerasa viral también co-transcripcionalmente añade CAP y poliadenila los ARNm de en sus extremos 5' y 3', respectivamente (Barik, 1993). Se ha demostrado que la inhibición de la guanilación del ARNm puede prevenir la síntesis de los transcritos del virus de longitud completa (Liuzzi *et al.*, 2005).

Los 2,162 aminoácidos de la proteína L del O. humano son similares entre los otros neumovirus. Las alineaciones de secuencias de aminoácidos mostraron que la proteína L tiene una extensión amino-terminal de 70 aminoácidos con relación a las otras, se sugiere que debe a la superposición con M2 y el uso de un nuevo sitio de inicio de la traducción (Stec *et al.*, 1991). La señal de terminación / poliadenilación se localiza en los nucleótidos 56-68 dentro del gen L, la señal de terminación / poliadenilación interna es un atenuador de la transcripción del gen L (Collins *et al.*, 1987). Una sustitución aa en la posición 1049 o 1169 en la proteína L se asoció con una eficiencia reducida de terminación a las señales GE, dando como resultado una síntesis aumentada de ARNm policistrónicos y una eficiencia de crecimiento reducida (Knipe, 2013).

Se ha demostrado que N, P y L son necesarios y suficientes para la replicación del virus, pero la procesividad de transcripción es baja porque las dos enzimas compiten las mismas subunidades y plantilla de proteínas, el procesamiento de transcripción completa aumenta con la inclusión de la proteína M2-1, pero a un nivel más alto, M2-1 inhibe la transcripción y la replicación del ARN (Yunus *et al.*, 1998, Collins *et al.*, 1996). Estas cuatro proteínas forman el complejo ribonucleoproteico (RNP).

**Proteínas M2-1 y M2-2.** Están codificadas por el ARNm de M2, que contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF) traslapados en el cistron M2. El ORF1 en dirección 3' codifica la proteína M2-1 y el ORF2 dirección 5' codifica la proteína M2-2 (Collins *et al.*, 1995).

La proteína M2-1 de 194 aminoácidos, es un factor anti-terminación que promueve la elongación de la cadena transcripcional y aumenta la frecuencia de la lectura a través de las uniones de genes, mejorando la síntesis de ARNm policistrónicos. En su ausencia, la polimerasa viral termina prematuramente y de forma no específica dentro de varios cientos de nucleótidos del extremo 3' del genoma, y los genes en este extremo no se transcriben significativamente (Fearn and Collins, 1999). También inhibe la eficiencia de terminación en las señales de transcripción GE posiblemente un reflejo de la misma actividad de procesividad, produciendo una mayor producción de ARNm de lectura policistrónica (Hardy and Wertz, 1998).

Existe en una forma fosforilada y una no fosforilada en células infectadas, y forma un homotetrámero a través de un dominio de oligomerización en los residuos 32 a 63 (Tran *et al.*, 2009). Contiene un motivo conservado de zinc de cisteína-histidina (C-X7-C-X5-C-X3-H) cerca de su extremo N-terminal (residuos 7 a 25) es esencial para el plegamiento adecuado de toda la proteína y para su actividad y las interacciones con el ARN (Cartee and Wertz, 2001). Es una proteína de unión al ARN, e interactúa con el por medio de la proteína P (Cuesta *et al.*, 2000). En contraste con la replicación, la transcripción de Orthopneumovirus requiere la proteína M2-1.

La proteína M2-2 es una proteína pequeña de 83-90 aminoácidos (Collins *et al.*, 1990) es indispensable para la replicación, regula la transcripción a la replicación de ARN, inhibiendo su síntesis (Bermingham and Collins, 1999).

### **1.3. Ciclo replicativo.**

Se sugiere que la unión implica interacciones con balsas lipídicas enriquecidas en glicosfingolípidos y colesterol, con caveolina ricos en colesterol, que existen comúnmente como invaginaciones la membrana plasmática (Smart *et al.*, 1999).

La unión y entrada del virus a la célula huésped depende de las interacciones entre las proteínas G y F con numerosas moléculas en la superficie celular. Son capaces de unirse a GAG celulares, especialmente heparán sulfato y sulfato de condroitina B (Feldman *et al.*, 1999) y algunas moléculas receptoras, incluyendo la molécula de adhesión intracelular (ICAM) -1, el receptor fractalina CX3CR1, y anexina II. RhoA que facilita la formación de sincitios, esta involucrada en movilización de actina y la transducción de señales (Pastey *et al.*, 1999), la unión a la proteína celular nucleolina también está mediada por la proteína F (Tayyari *et al.*, 2011), al igual que receptores LPS en particular TLR4 (Kurt-Jones *et al.*, 2000). El virus también utiliza el citoesqueleto del huésped, las subestructuras virales se asocian con actina polimerizada a lo largo del ciclo infeccioso (Ulloa *et al.*, 1998).

La internalización se produce rápida y eficientemente por fusión de membranas independiente de acidificación (Kryzaniak *et al.*, 2013). Los ARNm y proteínas pueden detectarse intracelularmente en 4-6 horas después de la infección y alcanzar un pico en 15 a 20 horas. La liberación de la progenie del virus comienza entre las 10 y 12 horas después de la infección y alcanza un pico después de 24 horas y continúa hasta que las células se deterioran en 30 a 48 horas (Knipe, 2013).

Después de la fusión, el complejo de ribonucleoproteína (RNP) se libera en el citoplasma y comienza la transcripción y replicación del genoma, los cuales se producen al mismo tiempo, la proteína M2-2 media el equilibrio de la síntesis transcripción de ARN a replicación de ARN (Bermingham and Collins, 1999).

El gradiente de transcripción polar se debe a la caída de la polimerasa, y por lo tanto los genes promotor-proximales se expresan de manera más eficiente. Este gradiente de expresión no es muy pronunciado, con la excepción del ARNm de L, al parecer debido a un efecto post-transcripcional en lugar de una disminución de la polimerasa (Collins and Wertz, 1983). Las diferencias en la eficacia de terminación de las diversas señales GE pueden también tener efectos sobre los niveles relativos de expresión génica. Por ejemplo, si una señal GE es particularmente ineficiente, una mayor fracción de la polimerasa continúa la síntesis en el siguiente gen para producir un transcrito de lectura, en lugar de terminar y reiniciar para producir una transcripción individual del siguiente gen (Harmon *et al.*, 2001).

Las nucleocápsides se ensamblan en el citoplasma y luego se mitigan con la proteína M hacia la membrana celular donde están presentes las glicoproteínas víricas, que contienen balsas lipídicas modificadas por los virus, para liberarse las partículas víricas por gemación en la membrana plasmática (Arslanagic *et al.*, 1996) en la superficie apical de células epiteliales polarizadas de las vías respiratorias (Zhang *et al.*, 2002). Los requerimientos mínimos de proteína viral para la formación de partículas similares a virus capaces de administrar el genoma viral son las proteínas F, M, N y P (Knipe, 2013).

#### **1.4. Variabilidad antigénica y genética.**

Existe un solo serotipo de O. bovino con cuatro subtipos o grupos antigénicos: A, B, AB y sin tipo basados por las diferencias en G, F y N mediante pruebas de neutralización y anticuerpos monoclonales específicos. Para la variación de nucleótidos, se toman en cuenta la secuencia del gen G que divide en seis subgrupos genéticos diferentes (I, II, III, IV, V, VI), y los genes N y F en cinco subgrupos (I, II, III, IV, V+VI), esto se observa en la figura siete, donde se observan los subgrupos del gen de la proteína G, F y N de izquierda a derecha respectivamente (Valarcher *et al.*, 2000, Sarmiento-Silva *et al.*, 2012). El subgrupo antigénico B lo conforman los virus del genotipo I. El A los virus del genotipo III. El AB los del grupo II, IV, V, VI (Spilki *et al.*, 2006). El no clasificado es un virus holandés de 1986 (Furze *et al.*, 1997).

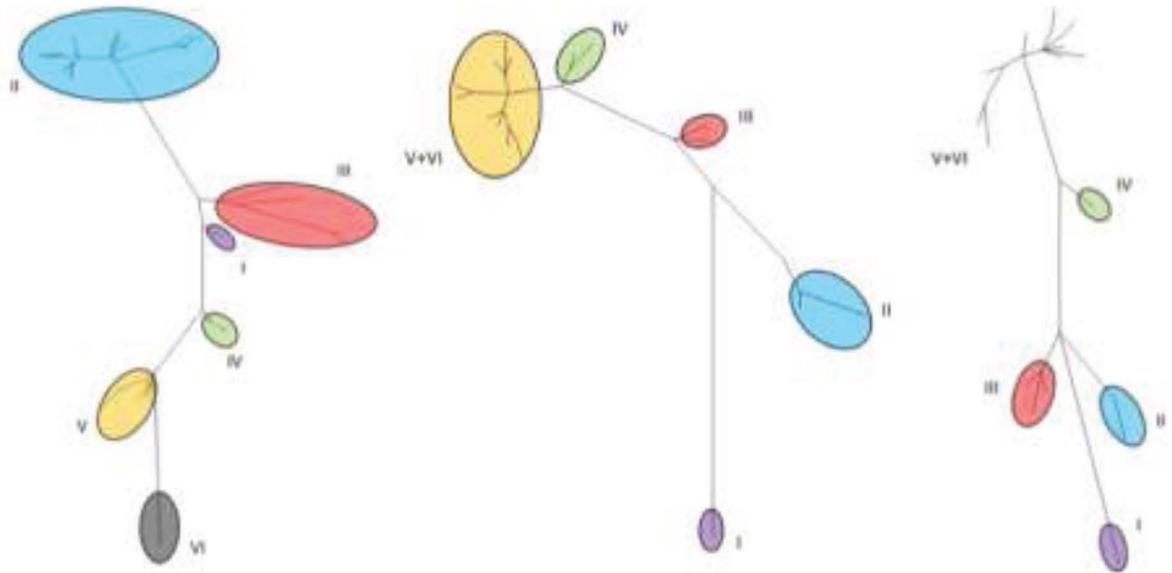


Figura 7. Árboles filogenéticos de G, F y N. Tomada de Sarmiento-Silva *et al.*, 2012.

Valarcher J-F. en el 2000 reporta cambios en los genes de las proteínas N, F y G de VSRB en 87 aislamientos en 32 años, demostrando la fuerte presión selectiva en la proteína G y en sitios particulares de N y F, regiones N2 (147-153), F1(202-218), y F3 (389-401) que están potencialmente expuestos en la superficie de las proteínas, pero parecen estar bajo limitaciones estructurales selectivas más fuertes que limitan su evolución (Valarcher *et al.*, 2000).

Larsen menciona que el porcentaje de divergencia de N y F es del 2% mientras que para G es del 8% (Larsen, 2000), aunque la variación de la secuencia de nucleótidos del gen variable G de BRSV no superó el 11% entre los aislados independientes (Larsen *et al.*, 2000). Mallipeddi en 1993 reporta una divergencia máxima del 19% cuando se compararon los dominios extracelulares de las proteínas G, de diferentes aislados 18% mas larga en nucleotidos y hasta 6 aminoacidos en C-terminal, sin diferencia antigenica entre cepas. Esta región no estaba perfectamente conservada entre cepas de O. bovino (Mallipeddi and Samal, 1993).

Los cambios en el ectodominio de la glicoproteína G, están relacionados con la gran variación antigénica, y las 2 regiones de tipo mucina se asocian con el posible sitio de unión al receptor y formación de los grupos antigénicos (Valarcher and Taylor, 2007, Melero *et al.*, 1997). Las mutaciones que ocurren en las posiciones 177 y 180 pueden tener sólo un efecto local sobre la superficie antigénica, sin influir en la estructura, mientras que las mutaciones en las posiciones 183 y 184 probablemente tendrán consecuencias estructurales importantes (Langedijk *et al.*, 1997).

Está demostrado que las mutaciones en la parte central conservada del ectodominio de la glicoproteína G resultan en la pérdida de cuatro residuos de Cys y en la supresión de dos puentes disulfuro y una hélice, en algunos aislados de campo, una o varias de las cisteínas se mutan a Arginina (R), alanina (A) o asparagina (N), (Spilki *et al.*, 2006) como se muestra en la figura 8, mutaciones críticas para la estructura tridimensional de la glicoproteína G, afectando la región central conservada e inmunodominante, utilizándolo como mecanismo de evasión del sistema inmune por lo tanto se demuestra que la evolución de *O. bovis* debe tenerse en cuenta en el desarrollo de futuras vacunas (Valarcher *et al.*, 2000, Langedijk *et al.*, 1997).

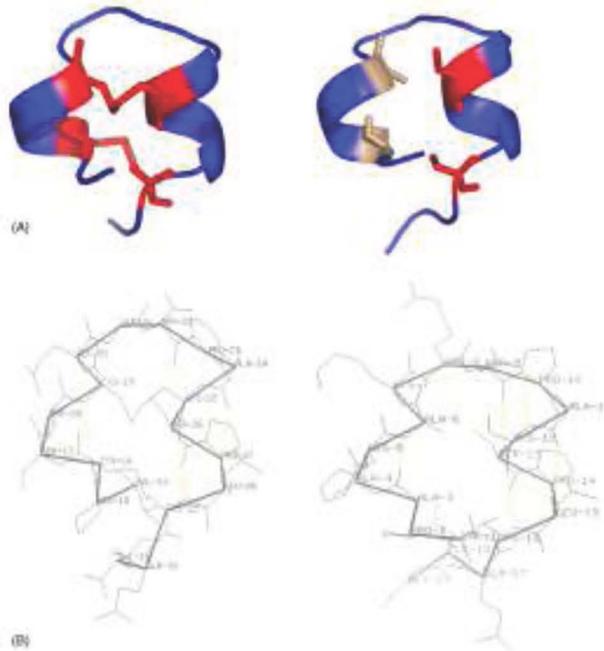


Figura 8. Representación de las mutaciones en el nudo de cys. Tomada de Spilki *et al.*, 2006.

Por lo descrito anteriormente los primeros estudios de variabilidad se han centrado en la glicoproteína G, que ha demostrado ser la proteína más variable, es conocida por favorecer el alojamiento de cambios en la secuencia, es objetivo para los anticuerpos neutralizantes, y objeto de una fuerte presión selectiva sobre la región similar a la mucina, evoluciona más rápidamente y es altamente tolerante a la fijación de mutaciones (Valarcher *et al.*, 2000, Martinez and Melero, 2000, Harris and Werling, 2003).

El O. bovino muestra una agrupación por área geográfica y fecha de aislamiento según la proteína G. En el subgrupo I se encuentran virus Europeos viejos desde 1976, y de Brasil recientes. En el subgrupo III virus exclusivos de Estados Unidos. Los subgrupos II, IV, V y VI virus aislados recientes de Europa, cepas del norte de Europa, Dinamarca, Suecia, Bélgica, Republica Checa, Noruega y Polonia son agrupadas en el subgrupo II, mientras en Holanda, Inglaterra, Bélgica y Francia los subgrupos II, IV, V y VI (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012, Spilki *et al.*, 2006, Bidokhti *et al.*, 2012, Klem *et al.*, 2014, Socha, 2009).

La variación genética es una característica de los virus ARN, las tasas de mutación se han estimado en el intervalo de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  sustituciones por nucleótido por ciclo de replicación. Esto se le atribuye a la ausencia o baja eficiencia de la actividad de corrección y reparación en las ARN polimerasas dependientes de ARN viral.

Las poblaciones de virus de ARN evolucionan como distribuciones dinámicas de genomas mutantes estrechamente relacionados que existen en equilibrio alrededor de una secuencia consenso, proporcionando evidencia de dinámica de cuasiespecies, lo que implicaría la presencia de un reservorio variante para la adaptación viral (Deplanche *et al.*, 2007).

Larsen en el 2000 menciona que a pesar de la presencia de un gran espectro mutante, las secuencias consenso de G de cada población de O. bovino fueron idénticas, de acuerdo con los resultados obtenidos después de los pasajes de O. bovino en células o becerros (Larsen *et al.*, 2000).

Cuando se analizó el espectro mutante de poblaciones derivadas de un aislado de campo de *O. bovinus*, los resultados indicaron la aparición de una secuencia genómica dominante en poblaciones de *O. bovinus*, que oscila entre el 48 y el 68% del genoma, junto con varias variantes, lo que sugiere que el *O. bovinus* está bien adaptado a su entorno biológico, la variabilidad genética del 11% *O. bovinus* fue probablemente moldeada por presiones selectivas positivas del entorno replicativo.

El análisis secuencial de clones reveló heterogeneidad genética importante en la región codificante de G de cada población, con frecuencias de mutación que van desde 6.8 a  $10.1 \times 10^{-4}$  sustituciones por nucleótido. Las mutaciones no sinónimas fueron mapeadas dentro de las dos regiones antigénicas variables del ectodominio o cercanas al dominio altamente conservado. Estos resultados sugieren que las poblaciones de *O. bovinus* pueden evolucionar como multitudes mutantes complejas y dinámicas, a pesar de la aparente estabilidad genética. La generación continua de virus mutantes se considera actualmente como una estrategia clave de adaptación de los virus ARN (Deplanche *et al.*, 2007).

### **1.5. Patogenia.**

La gravedad de la lesión no suele correlacionarse con la carga viral o la distribución viral, lo que sugiere que gran parte del daño tisular es el resultado de la respuesta del huésped y no de la infección viral primaria (Gershwin, 2007).

**Signos clínicos.** Se estima que el tiempo de incubación es de 2 a 5 días. La replicación viral es detectable a partir de 2 a 3 días después de la infección y continúa hasta 7 a 10 días después de la infección (Sacco *et al.*, 2014).

La infección puede ser subclínica e involucrar el tracto respiratorio superior o las regiones superior e inferior del árbol respiratorio (Valarcher and Taylor, 2007). Los signos clínicos se observan con frecuencia entre 7 y 10 días después de un evento estresante, o pueden tardar hasta 30 días o más. Estos pueden variar de mínimo a severo con disnea y muerte.

Los terneros afectados pueden tener taquipnea, secreciones serosas oculares, hocico seco, actividad reducida, anorexia y fiebres de hasta 40 ° C. Con infecciones graves, la disnea puede ser pronunciada y marcada (Sacco *et al.*, 2014).

**Lesiones macroscópicas.** Se caracterizan por lesiones atelectáticas, colapsadas, tienen una distribución craneoventral en el pulmón y consisten en áreas de consolidación bilaterales, multifocales, color rojo ciruela, bien delineadas, en algunos casos rodean los lóbulos del pulmón color rosado hiperinflado (Sacco *et al.*, 2012).

**Lesiones microscópicas.** Hay infiltración de macrófagos, linfocitos y neutrófilos. Los bronquiolos están llenos de neutrófilos, células epiteliales desprendidas y restos celulares necróticos. Hay pérdida completa del epitelio de las vías respiratorias por la necrosis de células epiteliales bronquiales. Las células epiteliales forman sincitios (Sacco *et al.*, 2012). Los sincitios pueden estar presentes en el epitelio de la vía aérea que recubre los bronquios y los bronquiolos, así como en los macrófagos alveolares y los neumocitos de tipo II (Maclachlan *et al.*, 2011). Los cambios, pueden ir desde el hinchamiento agudo de las células hasta la necrosis. Los bronquiolos pueden contener una secreción espumosa a mucopurulenta. Hay neumonía intersticial con enfisema que afecta a todos los lóbulos pulmonares, resultando en neumotórax, o neumopericardio. Los ganglios linfáticos pulmonares pueden estar agrandados, edematosos o incluso hemorrágicos (Kimman *et al.*, 1989b).

## **1.6. Inmunidad.**

La protección contra la infección es de corta duración después de la infección natural, pero los signos clínicos en la infección posterior son menos graves.

Este virus modula la respuesta inmune para evitar la estimulación de una respuesta de células T citotóxicas CD8 y en su lugar promueve una respuesta Th2, estimula la producción de anticuerpos IgE y deprime la producción de citocinas Th1 e interferón gamma. Las células inmunes innatas tienen un papel fundamental en la respuesta adaptativa al virus, con secreción selectiva de citocinas por células dendríticas pulmonares (Gershwin, 2012).

El virus escapa de las respuestas celulares mediante una acción de las proteínas NS1 y NS2, por ello juegan un papel importante en la regulación del IFN, mediando la resistencia a la respuesta antiviral (Bossert and Conzelmann, 2002). Los genes que codifican IFN $\alpha$  /  $\beta$  son inducidos por la infección del virus. Los IFN se unen a receptores de superficie celular independientes y activan vías de transducción de señales a través de las vías JAK / STAT. Además, los IFN pueden inhibir el crecimiento celular y promover la apoptosis, restringiendo así la propagación del virus. Son un componente importante de la defensa innata del anfitrión (Bossert *et al.*, 2003). Las proteínas NS muestran una actividad protectora, y se sugiere que tienen una protección diferencial en células de diferentes huéspedes. Esta capacidad diferencial de IFN de las proteínas NS proporciona una base para el desarrollo de vacunas vivas atenuadas (Schlender *et al.*, 2000).

La inducción del promotor de IFN-  $\beta$  depende de la activación de factores de transcripción distintos, NF-KB, ATF-2 / c-Jun y factor regulador de IFN 3 (IRF-3). La fosforilación y la actividad transcripcional de IRF-3, sólo se observaron después de la infección. La inhibición de la activación de IRF-3 y la inducción de IFN mediada por las proteínas NS debe tener un impacto considerable en la patogénesis e inmunogenicidad de O. bovino. La delección de NS2 disminuyó su capacidad de inducir la activación del factor de transcripción NF-KB (Bossert *et al.*, 2003, Spann *et al.*, 2005). La disminución de la expresión de NS1 o NS2 reduce la activación de NF-KB y AKT (proteína quinasa B), acelerando el inicio de la apoptosis. Por lo tanto, las dos proteínas NS, prolongan la vida de la célula y aumentando el rendimiento viral (Knipe, 2013).

### **1.7. Vacunación.**

A pesar de décadas de investigación, no hay un tratamiento eficaz, ni una vacuna efectiva. Para controlar las infecciones en humanos se utilizan vacunas, compuestos antivirales y anticuerpos monoclonales neutralizantes (anti-G glicoproteína, anti-SP o anti-CX3CR1) (Tripp *et al.*, 2003). Las vacunas inactivadas no sólo han demostrado ser ineficaces, sino que también han demostrado exacerbar la gravedad de los síntomas clínicos en una infección recurrente con una cepa de campo (Kim *et al.*, 1969), mientras que las vacunas de virus vivo son simplemente ineficaces. Los antígenos son demasiado distintos antigénicamente para proporcionar protección cruzada (Yunus *et al.*, 1998).

Por costos de producción las herramientas que se usan para humanos no son viables para la industria ganadera. Para los bovinos, el objetivo básico de la vacunación no es prevenir la infección sino prevenir a la enfermedad asociada al tracto respiratorio inferior (Meyer *et al.*, 2008). Se utilizan vacunas inactivadas o atenuadas y recientemente vacunas de subunidades con adyuvantes por vía intranasal (Blodorn *et al.*, 2014). Para el ganado las vacunas están disponibles porque los riesgos menores son aceptables en el ganado, aunque se han reportado 2 casos de enfermedad por vacunación, el primer caso por vacuna de virus vivo modificado (Kimman *et al.*, 1989a) y el segundo por una vacuna inactivada (Schreiber *et al.*, 2000), puede ser una consecuencia de una respuesta predominante de las células Th2, con la liberación de citocinas inflamatorias en ausencia de una respuesta de células T CD8. Esta respuesta anormal de Th2 puede ser reproducida por inmunización con vacunas recombinantes que expresan solamente la proteína G del virus (Maclachlan *et al.*, 2011).

Los problemas a los que se enfrenta la vacunación incluyen la corta protección inducida, la necesidad de inmunizar animales inmunológicamente inmaduros, la ineficacia de la vacuna en presencia de anticuerpos maternos. Otro problema podría ser la existencia de quasiespecies sobre la vacunación, aunque aún no está clara, se puede suponer que un virus infeccioso escapa más fácilmente de la respuesta inmune dirigida contra sólo un epítipo contra varios epítipos. Además, una vacuna atenuada viva con una única mutación de atenuación será altamente propensa a la reversión a la virulencia que una cepa con varias mutaciones de atenuación (Meyer *et al.*, 2008).

### **1.8. Diagnóstico.**

Para la identificación del antígeno se han reportado el uso de Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica de tejido pulmonar.

También se puede realizar el aislamiento viral y titulación a partir de muestras de tejido pulmonar, desafortunadamente el virus es lábil y puede ser difícil de realizar, especialmente para las muestras del campo (Sacco *et al.*, 2014, Larsen, 2000). La mejor muestra para utilizar es tejido con lesiones típicas en los campos pulmonares craneoventrales, en las primeras etapas de la enfermedad clínica (Larsen *et al.*, 1999).

Para la detección de ácidos nucleicos se realizan RT-PCR, qRT-PCR y pruebas multiplex para la identificación de varios agentes respiratorios (Sacco *et al.*, 2014, Larsen *et al.*, 1999).

Para la detección de anticuerpos se puede realizar ELISA que detectan anticuerpos específicos de O. bovino en suero y leche, proporcionando resultados para la evaluación de la inmunidad materna en terneros antes de la vacunación, para la identificación de vacas expuestas al virus y los hatos libres de infección (Klem *et al.*, 2013).

### **1.9. Epidemiología.**

El virus puede transmitirse por aerosoles o por contacto directo con secreciones nasales de animales infectados o indirectamente por superficies contaminadas (Hagglund *et al.*, 2006). Se considera que el estrés causado por el movimiento, el hacinamiento y los cambios de temperatura juegan un papel en los brotes de bovinos (Van der Poel *et al.*, 1994, Sacco *et al.*, 2014). Los brotes de enfermedad respiratoria se presentan de forma anual tanto en ganado productor de leche como de engorda en todo el mundo. La periodicidad estacional de la infección es con mayor frecuencia durante el período de otoño e invierno causando neumonía enzoótica en terneros lecheros jóvenes pero también durante los meses de verano (mayo a agosto) provocando neumonía de verano en terneros lactantes, esto indica que se produce la circulación del virus entre manadas durante todo el año (Bidokhti *et al.*, 2012, Klem *et al.*, 2013, Sacco *et al.*, 2014).

Los mecanismos responsables que permiten que el virus sincitial respiratorio permanezca en una población no están bien entendidos. Una posibilidad que actualmente está en discusión es la persistencia viral (Valarcher *et al.*, 2001, De Jong *et al.*, 1996, Stott *et al.*, 1980), debido a que el O. bovino puede ser aislado de animales asintomáticos y puede persistir por varios meses (Ames, 1993) estos animales pueden comenzar a diseminar la infección bajo ciertas condiciones (Brodersen, 2010), otra posibilidad es la reinfección o reintroducción en los hatos de diferentes variantes virales, lo que hace que la vacunación sea ineficiente (De Jong *et al.*, 1996, Hagglund *et al.*, 2006).

La frecuencia de infecciones por O. bovino es muy alta en bovinos menores de 1 año de edad (Elvander, 1996). Mas del 70 % del ganado exhibe una respuesta serológica positiva contra O. bovino a la edad de 12 meses (Valarcher *et al.*, 2000) y siempre es mayor entre los individuos más jóvenes, se asocia a terneros menores de 6 meses de edad, debido a que la eficacia protectora de los anticuerpos derivados de la madre se considera incompleta, aunque el ganado de todas las edades puede ser re-infectado, y rara vez se observan signos de enfermedad del tracto respiratorio y eliminación de virus (Van der Poel *et al.*, 1994).

La seroprevalencia se ha reportado en diversos países, detectando anticuerpos en suero o leche, Costa y colaboradores indican que Uruguay tiene un 95%, además comparan con otros países en Canadá con 94%, Estados Unidos con un 95%, Inglaterra 100%, Irlanda con 94%. (Costa *et al.*, 2000). Otros autores reportan en Perú 80% (Victorio, 2004), Venezuela 83% (Obando *et al.*, 1999), Ecuador 80% (Saa *et al.*, 2012), Noruega 31% (Gulliksen *et al.*, 2009, Klem *et al.*, 2013) y países con diferentes climas como Suecia, la distribución no es uniforme, en el norte del 51% y en el sur del 89% (Elvander, 1996). Incluso en fauna silvestre en cérvidos 55% (Aguirre, 1995) y Bison 92% en Estados Unidos (Sausker and Dyer, 2002).

En México, se reporta una seroprevalencia del 90.8% detectada por ELISA indirecta con ganado mayor a 2 años de edad en Yucatán (Solis-Calderon *et al.*, 2007). En otro estudio realizado en zonas tropicales-húmedas del sureste del país con ganado productor de carne, se indica una la seroprevalencia detectada por ELISA indirecta del 85.50% (Cordova-Izquierdo, 2009). En Colima con ganado de doble propósito, la prevalencia detectada por ELISA indirecta fue del 50.8%, el porcentaje de ganado con al menos un animal positivo fue 93.2% y la edad fue el principal factor de riesgo (Figuroa-Chavez *et al.*, 2012).

Estos datos indican la presencia de anticuerpos para O. bovino en el país y sugieren una infección en la población, sin embargo, no existe información acerca de los genotipos que circulan en México.

El impacto del CRB es extenso con grandes pérdidas económicas para la industria ganadera se calcula en mil millones de pesos anualmente, debido a pérdidas por muerte, costos de vacunaciones y tratamiento, bajo rendimiento en la ganancia de peso, el rendimiento reproductivo, la producción de leche y la longevidad en el ganado reproductor (Griffin, 1997, Sacco *et al.*, 2012).

Las infecciones por O. bovino están asociadas con una alta tasa de morbilidad, del 60% al 80% (Larsen, 2000, Gershwin *et al.*, 2008), el virus podría ser responsable de más del 60% de las enfermedades respiratorias epizoóticas observadas en el ganado lechero (Elvander, 1996, Baker *et al.*, 1986, Uttenthal *et al.*, 1996) y de hasta 70% en el ganado de carne (Caldow *et al.*, 1988). Se dice que la alta morbilidad es debido a la rápida propagación del virus dentro de los hatos causando una prevalencia de hato hasta del 100% (Rossi and Kiesel, 1974). La mortalidad generalmente se encuentra entre 2% y 3% pero se han reportado tasas que pueden alcanzar hasta 20% en algunos brotes (Larsen, 2000, Gershwin *et al.*, 2008).

## **2. Justificación.**

En México hay evidencia serológica de la presencia del Orthopneumovirus bovino. Sin embargo, se desconocen los linajes virales que circulan en el país; por ello resulta importante su genotipificación por medio de la secuenciación de aislamientos obtenidos en México.

## **3. Hipótesis.**

Por medio de secuenciación es posible genotipificar al Orthopneumovirus bovino a partir de aislamientos obtenidos en México e identificar las variantes virales que circulan en el país.

#### **4. Objetivos.**

##### **4.1. Objetivo general.**

Genotipificar por medio de secuenciación de la nucleoproteína N y la glicoproteína G del Orthopneumovirus bovino de aislamientos obtenidos en México.

##### **4.2. Objetivos específicos.**

- Obtener muestras positivas por RT-PCR multiplex de los virus del CRB.
- Obtener aislamientos del Orthopneumovirus bovino de las muestras positivas.
- Genotipificar por medio de secuenciación de los productos de RT-PCR para la nucleoproteína N y la glicoproteína G de aislamientos obtenidos.
- Realizar el análisis filogenético de las secuencias obtenidas con las reportadas en el GenBank y establecer su relación filogenética.

#### **5. Material y Métodos.**

##### **5.1. Muestreo.**

Los animales que se muestrearon presentaban signos clínicos sugerentes a enfermedad respiratoria como fiebre, neumonía y moco. El fin zootécnico (uso o trabajo que se le destina a los animales) y las edades fueron indistintas, aunque la mayoría fueron becerros entre los 6 y 12 meses, se obtuvo una base de datos con información del municipio, rancho, tipo de producción, edad, vacunas e identificación del animal.

Las muestras clínicas que se utilizaron fueron sangre completa en tubos al vacío con EDTA y suero en tubos al vacío transportados y conservados en refrigeración, hisopo nasal en tubos con solución salina fisiológica, muesca de oreja y pulmón en crio-tubos, transportados en hielo seco y conservados a -70°C hasta su uso.

El total de animales muestreados fue de 141. Las muestras provenían de 8 estados del país: Ciudad de México, Hidalgo, Puebla, Tabasco, Chiapas, Jalisco, Estado de México y Morelos, el total de muestras aparece en el cuadro 2. Los muestreos se realizaron entre los meses de octubre y febrero de diferentes años, 2014 al 2017.

Estado	Animales	Edad	Vacunas	Sangre	Hisopo nasal	Pulmón	Oreja
CDMX	53	Adulto	s/d	47	47		6
Hidalgo	22	Becerras 1-12 meses	No vacunan	22	22		
Puebla	36	Becerras 1-12 meses	Solo bacterias	36	36		
Tabasco	2	Becerras 12 meses	Solo DVB, IBR				2
Chiapas	6	s/d	Rabia, Brucella, Bacterias.				6
Jalisco	7	s/d	s/d			4	6
Edo. de Méx.	4	Becerras 4-12 meses	s/d			1	
Morelos	10	Adulto	No vacunan		9	1	
Total	141	> Becerras	> No vacunan	105	114	6	20

Cuadro 2. Datos del muestreo. Las muestras de pulmón se obtuvieron de la porción craneoventral con lesiones sugerentes a la enfermedad, obtenidas de rastros.

## 5.2. Preparación de las muestras.

Para la sangre completa se separaron los linfocitos, realizando 3 lavados con agua destilada a 500 µl de sangre, eliminando los glóbulos rojos, centrifugando a 3,000 rpm/10 min/4 °C. Para las muestras de tejido se tomaron aproximadamente 3 g, se maceraron en un mortero con DMEM. Para las muestras de hisopo se tomó directamente el sobrenadante de los tubos. Una vez preparadas las muestras se procedió a realizar la extracción de ácidos nucleicos, el resto de la muestra se conservó para el aislamiento viral.

### 5.3. Extracción de ácidos nucleicos.

Se realizó la extracción de ARN para usarlo en la identificación del Orthopneumovirus bovino, Respiravirus bovino 3, y el virus de la diarrea viral bovina. Además se realizó la extracción de ADN para usarlo en la identificación del Alphaherpesvirus bovino 1. Estos ácidos nucleicos se utilizaron para una RT-PCR multiplex.

Para la extracción de ARN se utilizó TRIzol® Reagent (15596026 Invitrogen), que mantiene la integridad del ARN gracias a la inhibición eficaz de la actividad de RNasa. Las muestras se procesaron según las indicaciones del fabricante. En el cual se usa fenol para la degradación de tejido, cloroformo para la separación de ácidos nucleicos, tomando la fase acuosa donde se encuentra el ARN. Isopropanol para la precipitación del ARN, el cual se resuspendió en 30 µl de agua dietilpirocarbonato (DEPC) libre de RNasas.

Para la extracción de ADN se utilizó DNAzol® Reagent (10503027 Invitrogen). Se siguió el protocolo según las indicaciones del fabricante. En el cual se lisa (u homogeneiza) una muestra biológica y el ADN genómico se precipita mediante etanol. Tras un lavado con etanol, el ADN se resuspendió en 30 µl de agua inyectable.

### 5.4. RT-PCR multiplex.

Se realizó una RT-PCR multiplex, para la identificación de los virus del CRB en una sola reacción, patente en trámite MX/E/2012/081439, usando los siguientes iniciadores.

<b>Diarrea Viral Bovina RVS</b>	5' AAC TCC ATG TGC CAT GTA CAG CAG AG 3'
<b>Diarrea Viral Bovina FWD</b>	5' GCT AGC CAT GCC CTT AGT AGG ACT AGC 3'
<b>Orthopneumovirus bovino RVS</b>	5' TTT GCA CAT CGT AAT TGG GTA T 3'
<b>Orthopneumovirus bovino FWD</b>	5' GTA CCA ATG TCA ACC AAA TTC C 3'
<b>Respirovirus bovino 3 RVS</b>	5' ATA TAG AGC CAG TTG CGT T 3'
<b>Respirovirus bovino 3 FWD</b>	5' AAA GGA GTA GTT CAG ATT CTA GAT G 3'
<b>Alphaherpesvirus bovino 1 RVS</b>	5' CAC GTC TCG TAT ATG CGG ATG A 3'
<b>Alphaherpesvirus bovino 1 FWD</b>	5' GCC GTA CCA CTC CCA CGT AT 3'

Los pesos moleculares esperados son los siguientes.

<b>Diarrea Viral Bovina</b>	293 pb	5'UTR
<b>Orthopneumovirus bovino</b>	245 pb	N
<b>Respirovirus bovino 3</b>	199 pb	M
<b>Alphaherpesvirus bovino 1</b>	159 pb	gE

Se utilizó el kit OneStep® RT-PCR (210212 QIAGEN) y las concentraciones de los reactivos se siguieron según las indicaciones del fabricante y para los iniciadores fue de 10 µM para cada uno. La amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler® y las condiciones fueron las siguientes. Una Retrotranscripción de 30 min a 50 °C, la desnaturalización de 30 segundos a 94° C, alineamiento de 30 segundos a 56° C, la extensión de 1.5 minutos a 72° C, y una extensión final de 10 minutos a 72° C. Por 35 ciclos y los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 4% UltraPure Agarosa® (16500-500 Invitrogen), realizados en una cámara de electroforesis (ThermoScientific) con TAE al 1X, teñidos con bromuro de etidio UltraPure® (15585011 Invitrogen).

Como control positivo se utilizó la vacuna Pyramid® 5 de Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. que incluye los cuatro virus del CRB. Como control negativo agua inyectable.

### **5.5. Aislamiento viral en cultivo celular.**

Las muestras positivas al Orthopneumovirus bovino se seleccionaron para realizar el aislamiento viral en cultivo celular. Se utilizó la línea celular MDBK Madin-Darby Bovine Kidney ATCC® (CCL-22 ATCC) células de riñón de bovino, probadas por RT-PCR, para asegurar que estuvieran libres del virus de la diarrea viral bovina. Se utilizó un medio de mantenimiento compuesto por DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium®) y SFB Suero Fetal bovino® (10437028 Gibco) irradiado al 10%. Una parte se congeló para su preservación y la otra parte uso para el aislamiento del virus. La congelación de las células, se llevó a cabo con el medio para congelar Recover® Cell Culture Freezing Mediumy (12648010 Gibco) a -70 ° C.

Las muestras seleccionadas se maceraron en un mortero con DMEM, obteniendo aproximadamente 1 ml de inóculo, y se infectaron con un 80% de confluencia de la monocapa celular, en placas de 6 pozos eppendorf®. Las monocapas se lavaron previamente con PBS para eliminar restos celulares y suero antes de la inoculación. Las placas se quedaron con únicamente el inóculo por 2 horas en movimiento lento, posteriormente se le añadió 2 ml de medio de infección constituido por DMEM con SFB al 2% y antibiótico Penicilina-Estreptomicina 10,000 UI, incubándose a 37 ° C en una atmósfera de CO2 al 5% humidificado, observándolas cada 24 horas por 7 días, hasta la presentación de efecto citopático.

Paralelamente se infectaron células con los virus de referencia (ATCC® VR-148®) cepa Iowa (FS1-1) y (ATCC® VR-1339®) cepa 375 como control positivo, esto se inoculó en una placa aparte para evitar contaminación, al igual que el control negativo de células sin infectar. La cepa FS1-1 es un virus de lento crecimiento 5 a 7 días, fue obtenido de secreciones nasales de ganado de Iowa, U.S. con enfermedad respiratoria aguda, pertenece al subgrupo A, reportando como efecto citopático la formación de sincitios y degeneración celular.

La cepa 375, es un virus que crece en 4-7 días, ayuda a verificar el efecto citopático en una cepa de lento crecimiento, es obtenido de muestras clínicas de secreciones nasales de terneros en una manada con signos de enfermedad aguda del tracto respiratorio en Iowa, U.S. el efecto citopático es la formación de sincitios, redondeamiento de células, y desprendimiento. El virus es levemente patógeno para los terneros jóvenes, el título del virus congelado puede disminuir con el almacenamiento prolongado.

La cosecha del virus se realizó utilizando un sonicador Branson 5510DTH, para liberar el virus, se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos, para eliminar residuos celulares y el sobrenadante con virus se congeló a -70 °C y se utilizó para realizar la extracción de RNA y amplificación de los genes virales N y G.

### **5.6. Extracción de ácidos nucleicos de los aislamientos.**

Se utilizó para el ARN el kit de extracción por columnas de centrifugado QIAamp Viral RNA mini kit® (52906 QIAGEN), y para el ADN DNeasy Blood & Tissue Kit® (69506 QIAGEN). Se realizaron según las especificaciones del fabricante. Utilizando un volumen de muestra de 200 µl, de los aislamientos y de los sobrenadantes de los virus ATCC. Donde por medio de cargas los ácidos nucleicos permanecen adheridos a la membrana de la columna. Los ácidos nucleicos se colectaron en tubos de 1.5 nuevos, utilizando 30 µl del buffer AVE.

### **5.7. RT-PCR para la nucleoproteína N.**

Se utilizaron únicamente los iniciadores para el O. bovino del RT-PCR multiplex, en la cual, se obtuvo un fragmento de 245 pb.

**Orthopneumovirus bovino RVS** 5' TTT GCA CAT CGT AAT TGG GTA T 3'

**Orthopneumovirus bovino FWD** 5' GTA CCA ATG TCA ACC AAA TTC C 3'

Se uso el kit OneStep® RT-PCR (210212 QIAGEN) y las concentraciones de los reactivos se siguieron según las indicaciones del fabricante y para los iniciadores fue de 10 µM para cada uno. La amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler® con las mismas condiciones que el RT-PCR multiplex.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 4% UltraPure Agarosa® (16500-500 Invitrogen), realizados en una cámara de electroforesis (ThermoScientific) con TAE al 1X, teñidos con bromuro de etidio UltraPure® (15585011 Invitrogen). Se reservaron 10 µl de los productos de PCR para su posterior purificación.

Como control positivo se utilizaron los virus de referencia que se cultivaron junto con los aislamientos de las muestras clínicas. Y como control negativo el cultivo negativo.

### **5.8. RT-PCR anidado para la glicoproteína G.**

La amplificación de los productos para la glicoproteína se realizaron por medio de una RT-PCR anidada. Se uso el kit OneStep® RT-PCR (210212 QIAGEN) y las concentraciones de los reactivos se siguieron según las indicaciones del fabricante. Se usaron los siguientes iniciadores, a una concentración de 10 µM. Esperando un producto de 572 pb para la segunda ronda.

**FR Orthopneumovirus bovino RVS** 5' GGATCCTTAGATCTGTGTAGTTGATTG 3'

**FR Orthopneumovirus bovino FWD** 5' GGATCCATGTCCAACCATACCCATCATC 3'

**SR Orthopneumovirus bovino RVS** 5' GTGTTCTGGTGAAGAGAGGATGCC 3'

**SR Orthopneumovirus bovino FWD** 5' CCATTATTTACATTAGTGTGGGAAATGC 3'

La amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler® Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 4% UltraPure Agarosa® (16500-500 Invitrogen), realizados en una cámara de electroforesis (ThermoScientific) con TAE al 1X, teñidos con SYBR® Green SYBR® Safe DNA Gel Stain (S33102 Invitrogen).

Se cortaron las bandas y los productos obtenidos se purificaron con el kit de purificación QIAquick® Gel Extraction (28704 QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante, eluyendo la muestra en 30 µl y se clonaron.

Como control positivo se utilizaron los virus de referencia, cultivados como control positivo junto con los aislamientos de las muestras. Control negativo agua inyectable.

### **5.9. Clonación de los productos de la glicoproteína G.**

Se utilizó el kit CloneJET® PCR Cloning (K1231 Thermo Scientific®), usando el protocolo sticky-end cloning, reacción en hielo. Siguiendo las instrucciones del fabricante. este paso se utilizó para obtener mas producto para mandar a secuenciar, ya que las bandas del PCR anidado eran muy tenues.

#### **5.10. Secuenciación de la nucleoproteína N y glicoproteína G.**

Los productos de PCR de N se purificaron con E-Gel® SizeSelect® Gel de agarosa al 2% (G661002 Invitrogen). Se cuantificaron con un NanoDrop® Lite (ND-LITE-PR Thermo Scientific®). Al igual que los productos de G, se mandaron a secuenciar con ambos iniciadores al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, usando el equipo GENETIC ANALYZER APPLIED BIOSYSTEMS. La secuenciación se realizó por el método de Sanger.

#### **5.11. Alineamientos.**

Se realizó un Blast en NCBI. Posteriormente con el programa MEGA 6, utilizando Clustal W para el alineamiento de las secuencias de nucleótidos obtenidas tanto de FWD y RVS se ocuparon para realizar una secuencia consenso de cada muestra. Además, se realizó un archivo fasta con las secuencias reportadas en el GenBank para hacer un alineamiento múltiple con las obtenidas de los aislamientos, y para hacer el análisis filogenético. Para el alineamiento de las secuencias de aminoácidos se utilizó el programa MUSCLE, para su posterior análisis a nivel amínico.

#### **5.12 Reconstrucción filogenética.**

Se utilizó el programa MEGA 6. Se siguieron los siguientes pasos después del alineamiento. Para hacer el árbol filogenético se necesita escoger el modelo de sustitución de nucleótidos, por medio de la opción Analysis-Find Best Models (ML). Después se eligió el modelo recomendado, y se realizó la reconstrucción filogenética seleccionando un valor de 1000 bootstrap, desplegando el árbol filogenético, con el cual se puede establecer la relación filogenética de los aislados obtenidos con respecto a las secuencias repostadas en el GenBank y determinar el genotipo circulante en el país.

### **6. Resultados.**

Se obtuvieron 6 muestras de pulmón con lesiones sugerentes a la infección por el Orthopneumovirus bovino, como se observa en la figura 9.



Figura 9. Pulmón con lesiones craneoventrales.

#### **6.1. Identificación de muestras positivas a virus del CRB por RT-PCR multiplex.**

Para detectar las muestras positivas se realizó la extracción de ácidos nucleicos, para usarlos en la RT-PCR multiplex. En la figura 10 y 11, se observan las muestras positivas a CRB.

La figura 10 se observa un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En el control positivo se observan las cuatro bandas correspondientes a los cuatro virus del CRB, Alphaherpesvirus bovino 1 de 159 pb, Respirovirus bovino 3 de 199 pb, Orthopneumovirus bovino de 245 pb, diarrea viral bovina de 293 pb.

En el carril 1 se encuentra el control negativo (agua). En el 2 y 15 marcador de peso molecular de 50 pares de bases. Del 3 al 13 y 16 al 23 muestras (incluyen a las que posteriormente se utilizaron para los aislamientos en cultivo celular). Del 14 y 24 el control positivo (Vacuna Pyramid ® 5).

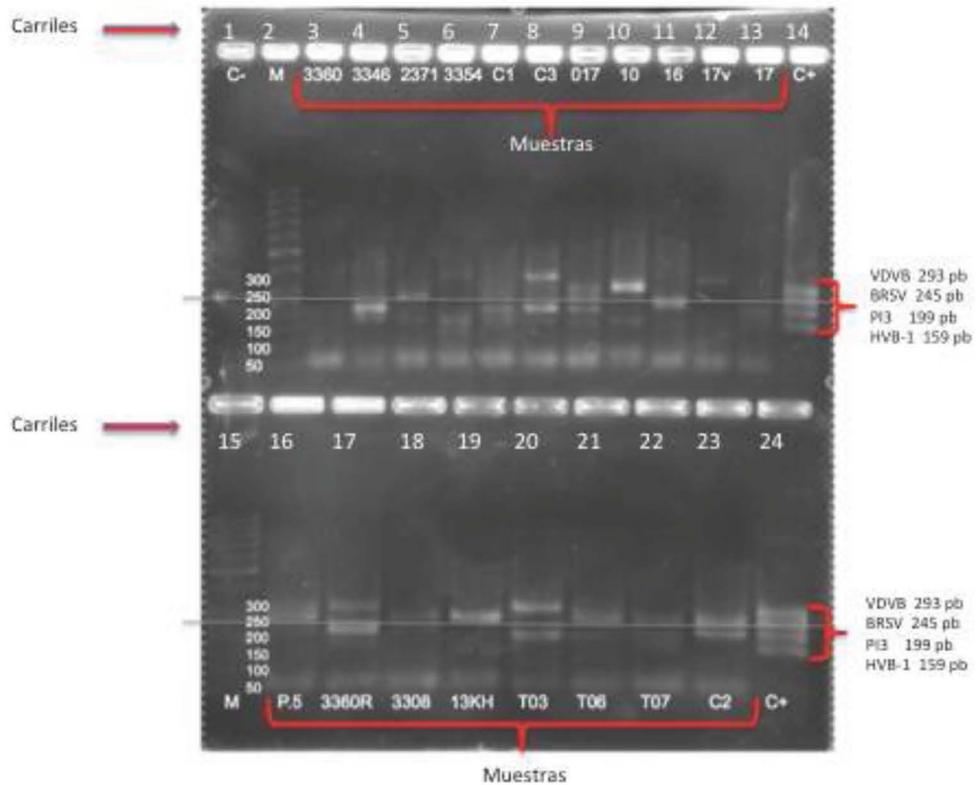


Figura 10. Gel con aislamientos positivos al CRB.

En la figura 11 se observa un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, En el carril 1 esta el marcador de peso molecular de 50 pares de bases, del carril 2 al 6 muestras (incluyen las que se utilizaron posteriormente para los aislamientos en cultivo celular) y en el carril 7 el control positivo (Vacuna Piramid 5).

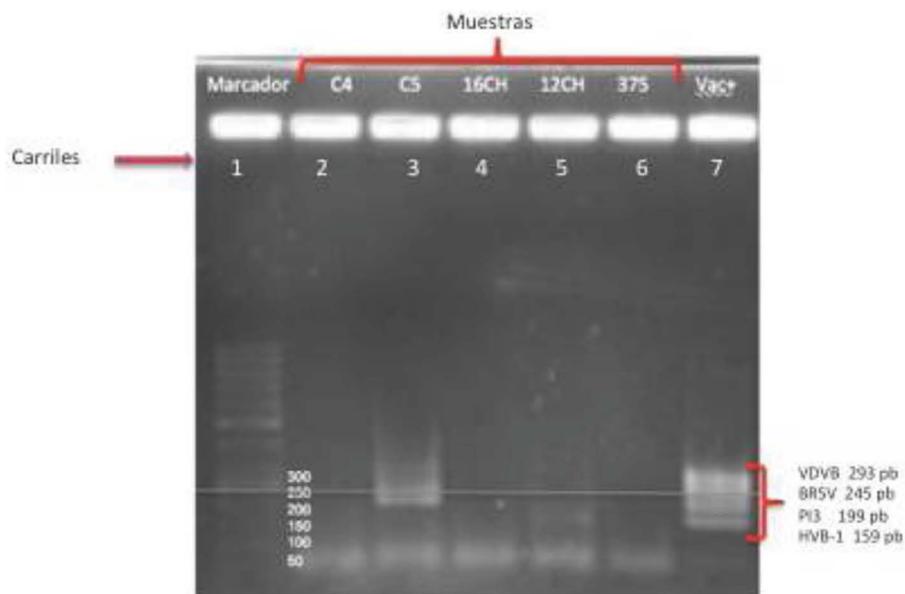


Figura 11. Gel con aislamientos positivos al CRB.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 3, se obtuvieron 56 muestras positivas, con 14 coinfecciones. Las muestras positivas al O. bovino se seleccionaron para realizar el aislamiento viral, a pesar de haber obtenido 13 no todas se pudieron aislar.

Estado	O. bovino	Herpesvirus	Respirovirus	DVB	Coinfecciones
CDMX	2	2	2	3	3
Hidalgo	0	0	0	12	0
Puebla	0	0	0	0	0
Tabasco	2	0	0	2	2
Chiapas	3	4	1	2	3
Jalisco	3	3	5	2	4
Edo. de Méx.	2	1	2	2	2
Morelos	0	0	0	0	0
SD	1	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>23</b>	<b>14</b>

Cuadro 3. Muestras positivas obtenidas por estado.

## 6.2. Aislamiento de *O. bovine* en cultivo celular.

Las muestras que se utilizaron para el aislamiento fueron pulmón y oreja. Se realizaron dos pases sucesivos, al primer pase se le denominó A y al segundo B.

En ambos pases se colocó un control negativo de células sin infectar como se observa en la figura 12 y se documentó con fotografías a los días 1, 3 y 5 postinoculación. También se colocó un control positivo con las cepas de referencia como se observa en la figura 13 y se fotografiaron a los días 1, 3 y 5 postinoculación, estos controles se cultivaron en placas individuales para evitar contaminación de los cultivos con el control positivo.

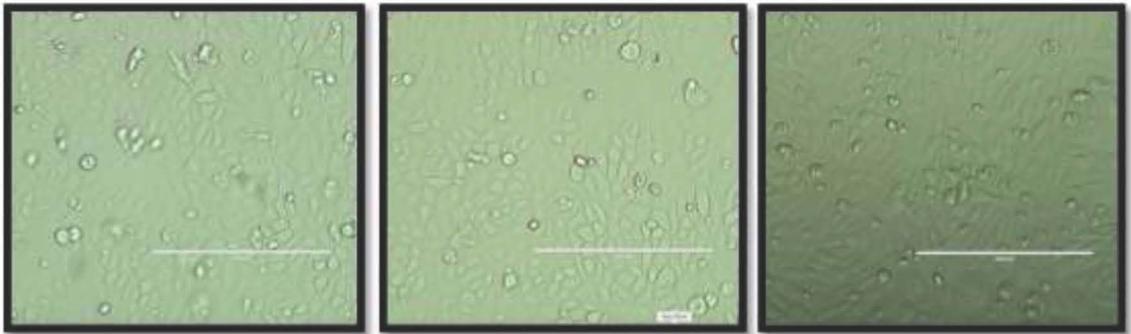


Figura 12. Control negativo de cultivo celular sin infectar. Día 1, 3 y 5 de izquierda a derecha.

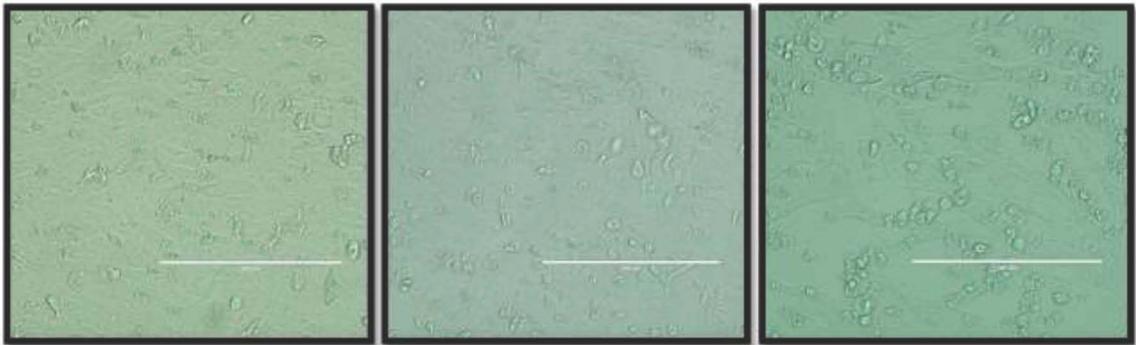


Figura 13. Control positivo de cultivo celular con el virus de referencia. día 1, 3 y 5 de izquierda a derecha.

El pase A de la muestra clínica 3308 se observa en la figura 14, al día 1, 3 y 5 postinoculación, la cual presenta un efecto citopático de vacuolas y muerte celular, que correspondía más a un efecto citopático de DVB, recordando que existían coinfecciones se decidió realizar el pase B.

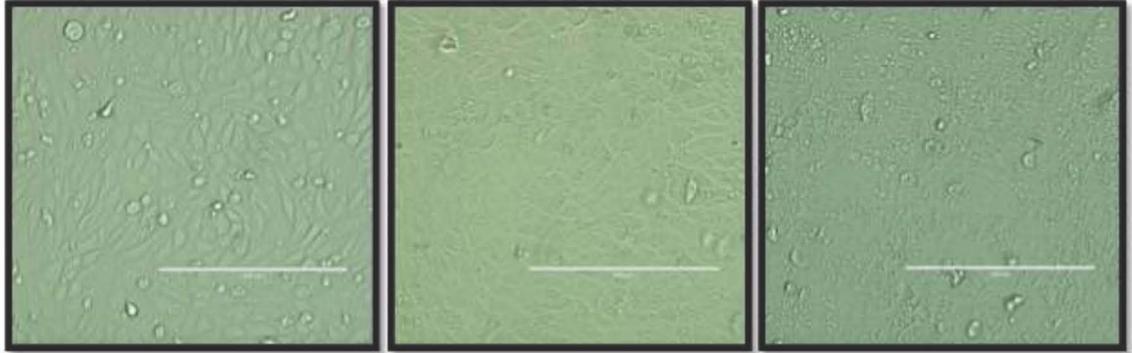


Figura 14. Pase A de la muestra 3308. Día 1, 3 y 5 de izquierda a derecha.

En el pase B, de la muestra 3308 se observa en la figura 15, se le dio seguimiento al día 1, 3 y 5 postinoculación, observando desprendimiento y muerte celular, y formación de sincitios.

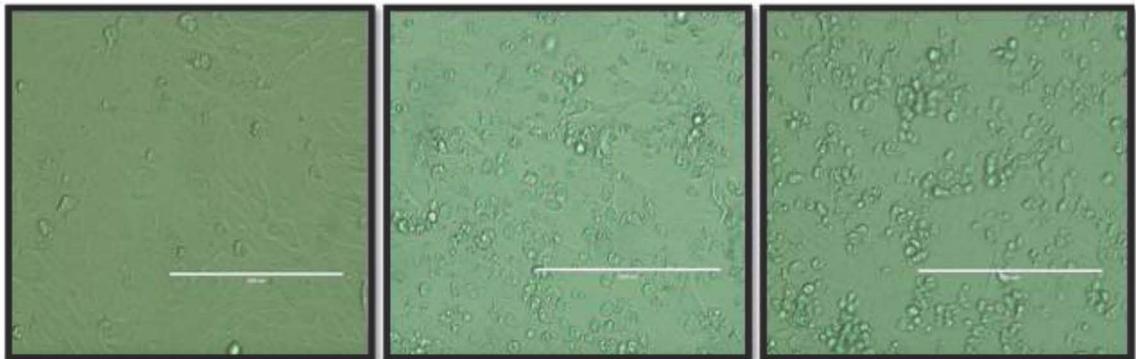


Figura 15. Pase B de la muestra 3308. Día 1, 3 y 5 de izquierda a derecha.

El efecto producido en las células se sugiere estar asociado a las coinfecciones virales, por ello se le realizó de manera individual una RT-PCR y PCR para comprobar la replicación viral en los cultivos, de los virus del CRB, en el siguiente figura 16, se muestra un gel de agarosa al 2% con los productos de PCR de cada uno de ellos.

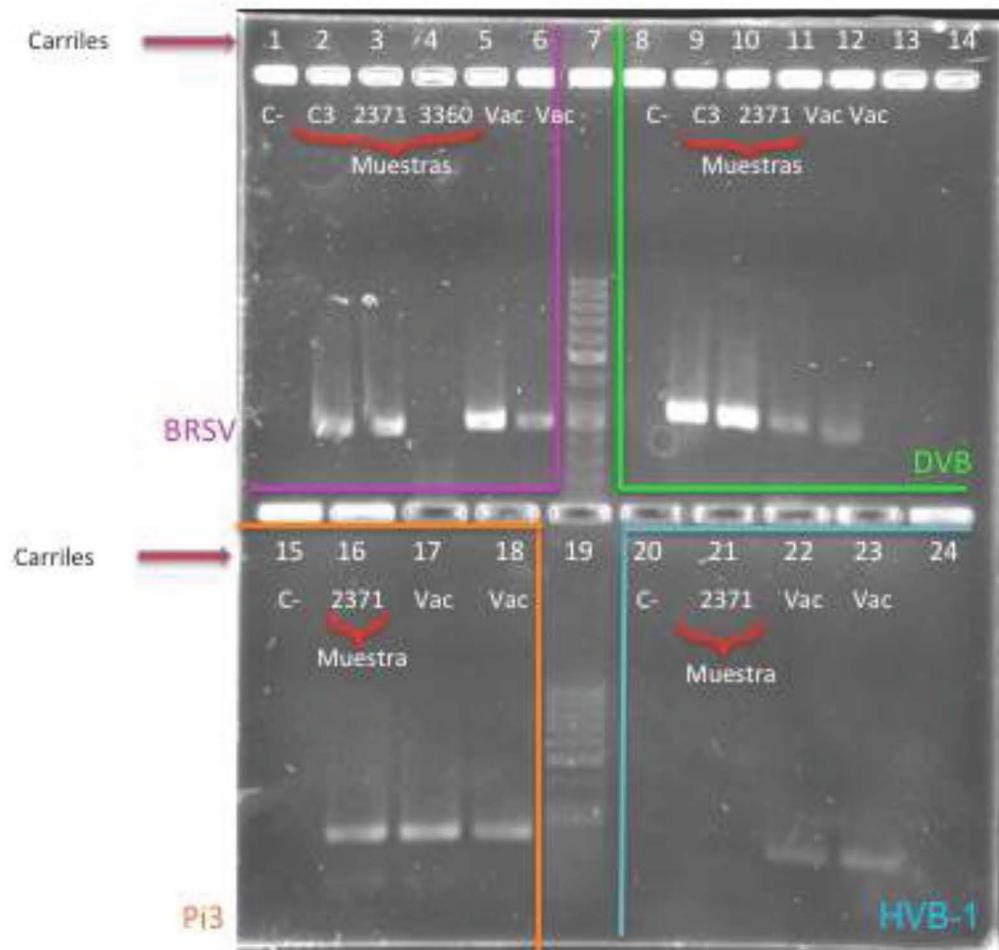


Figura 16. Gel con los productos del CRB por separado de los aislamientos

En gel se observan 4 cuadrantes que corresponden a los 4 virus del CRB de los aislamientos en cultivo celular, en el carril 7 y 19 se encuentra el marcador de peso molecular de 50 pares de bases. El control positivo en este gel es vacuna porque se probaron los 4 virus. Para los RT-PCR del *O. bovinus* se utilizaron los virus de referencia

### 6.3. Amplificación de los productos RT-PCR para la nucleoproteína N.

En total se pudo realizar el aislamiento de 11 muestras, en la siguiente figura 17, se muestra una gráfica con los estados donde se obtuvieron muestras positivas a *O. bovinus* y el porcentaje que representan.



Figura 17. Total de aislamientos de O. bovino por estados.

Dichos aislamientos se identificaron por medio de una RT-PCR individual tomando los iniciadores del multiplex, obteniendo un producto de 245 pb como se observa en el siguiente gel (figura 18). Los productos se purificaron con E-gel® Size Select gel de agarosa al 2%, para ser secuenciados.

En la figura 18 se observa un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En el cual se muestran las muestras positivas a los aislamientos del O. bovino, los productos que se aprecian son de 245 pares de bases, en el carril 14 se observa el control positivo del virus de referencia. Muestras positivas en el carril 1,2,3, 5,9, 11-13, 16-18.

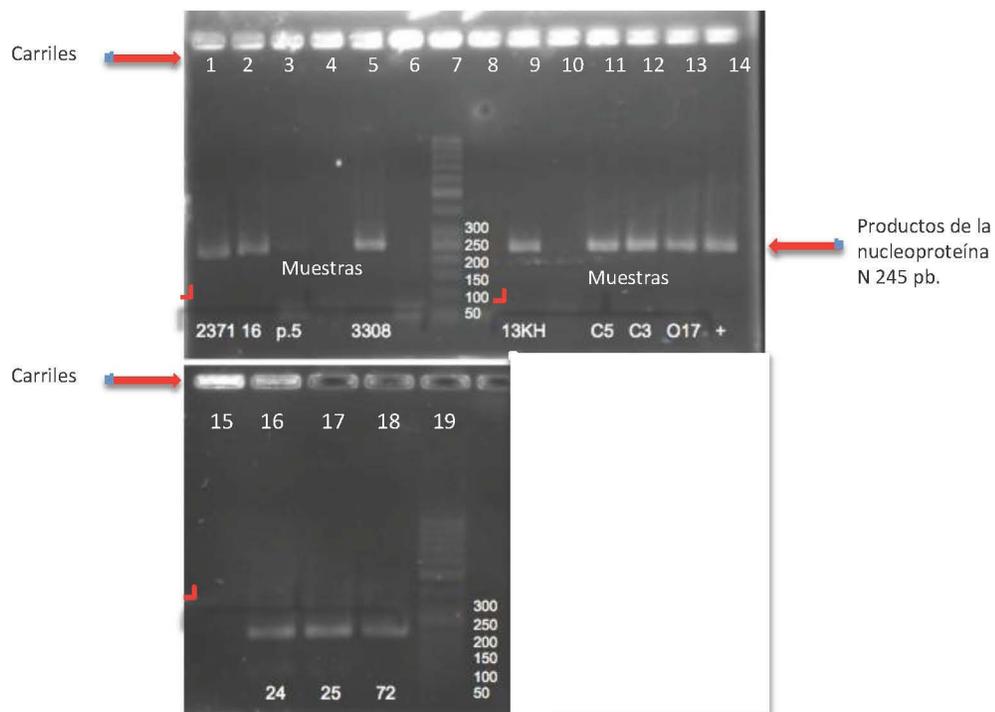


Figura 18. Gel con productos de la nucleoproteína N provenientes de los aislamientos.

#### 6.4. Amplificación de los productos RT-PCR para la glicoproteína G.

Se amplificaron los productos de PCR para la glicoproteína G. Posteriormente se clonó la proteína para obtener una mayor cantidad de muestra, la cual se utilizó para posteriormente realizar la secuenciación (figura 19).

En la figura 19 se observa en el carril 1 el marcador de 100 pares de bases, del carril 2 al 5, 7 y 9 productos de 572 pb que corresponden a los aislamientos en cultivo. En el decimo carril marcador de 100 pares de bases

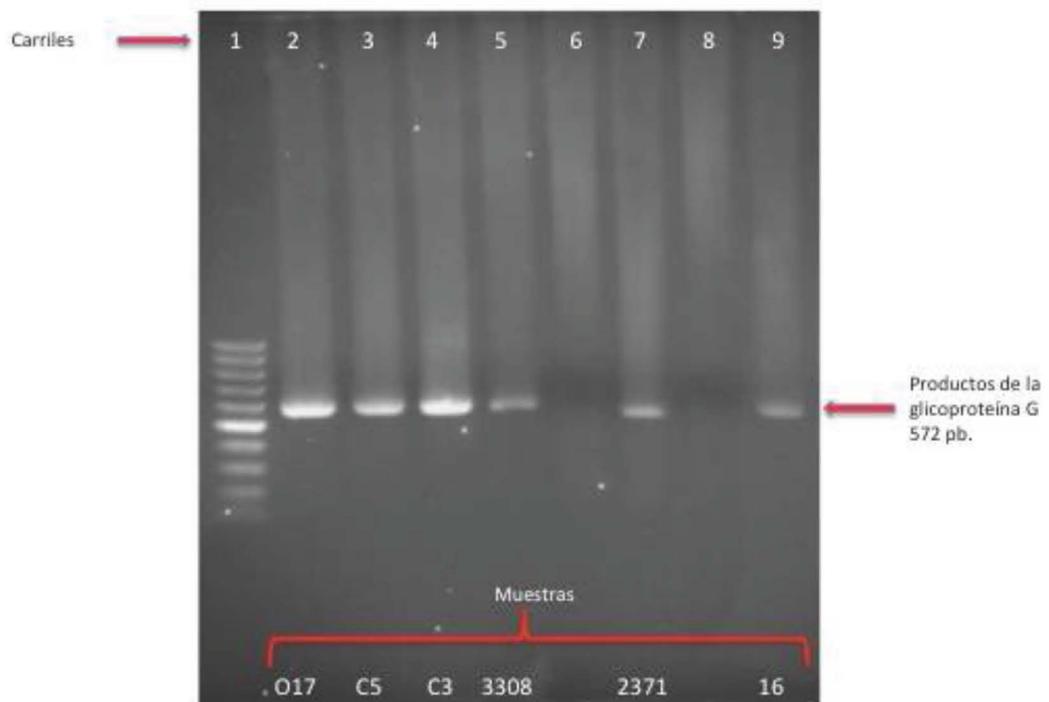


Figura 19. Productos amplificados de la glicoproteína G provenientes de los aislamientos.

### 6.5. Muestras para la secuenciación.

Para la secuenciación se obtuvieron 11 muestras para la nucleoproteína N, todas con muy buena calidad. Para las muestras de la glicoproteína G se obtuvieron 6 secuencias de buena calidad. Las muestras 72, 24, 25, 13KH y P5 para la glicoproteína G, tenían una mala calidad por lo que se decidió no usarlas para realizar los alineamientos y los árboles filogenéticos. Las secuencias obtenidas a partir de los aislamientos aparecen en el cuadro 4 y se nombraron de acuerdo a los siguientes datos, el nombre del virus (O.bov), UNAM, nombre de la muestra, proteína secuenciada (N ó G), estado del país de donde se obtuvo la muestra, México (MX) y año en el que se obtuvo la muestra.

Para N.	Para G
O.bov/UNAM/C5/N/JALISCO/14_MX_14	O.bov/UNAM/C5/G/JALISCO/14_MX_14
O.bov/UNAM/C3/N/JALISCO/14_MX_14	O.bov/UNAM/C3/G/JALISCO/14_MX_14
O.bov/UNAM/3308/N/CDMX /13_MX_13	O.bov/UNAM/3308/G/CDMX /13_MX_13
O.bov/UNAM/2371/N/CDMX /13_MX_13	O.bov/UNAM/2371/G/CDMX /13_MX_13
O.bov/UNAM/16/N/CHIAPAS /14_MX_14	O.bov/UNAM/16/G/CHIAPAS /14_MX_14
O.bov/UNAM/13KH/N/CHIAPAS /14_MX_14	
O.bov/UNAM/24/N/TABASCO/13_MX_14	
O.bov/UNAM/25/N/TABASCO/13_MX_14	
O.bov/UNAM/P5/N/EDOMEX/14_MX_14	
O.bov/UNAM/72/N/SD /12_MX_12	

Cuadro 4. Aislamientos obtenidos.

Para realizar la reconstrucción filogenética, las secuencias obtenidas del GenBank, se nombraron con el número de acceso, nombre de la cepa, lugar y año de donde provienen.

## 6.6. Reconstrucción filogenética de la nucleoproteína N en nucleótidos.

### 6.6.1. Árbol filogenético de las secuencias reportadas en GenBank para la nucleoproteína N.

**Alineamiento.** Se realizó un alineamiento con todas las secuencias reportadas para la nucleoproteína del GenBank, en total fueron 39 secuencias, de las cuales 1 de O. ovino y 2 de O. humano del subgrupo antigénico A y B que se tomaron como grupo externo.

**Reconstrucción filogenética.** Se utilizó el método neighbor joining, con un modelo de sustitución Tamura de 3 parámetros, con un valor de Bootstrap de 1000. El árbol se muestra en la figura 20. Este árbol se realizó debido a que el resto de las secuencias reportadas alinean en otro sitio diferente a nuestros oligonucleótidos, como se observa a continuación en el cuadro 4.

	Secuencias utilizadas para el árbol	Posición en el genoma
Árbol de las secuencias reportadas en GenBank para N	39	1243-1933
Árbol con las secuencias obtenidas en México para N	24	969-1223

Cuadro 5. Diferencias de los sitios de las secuencias de N.

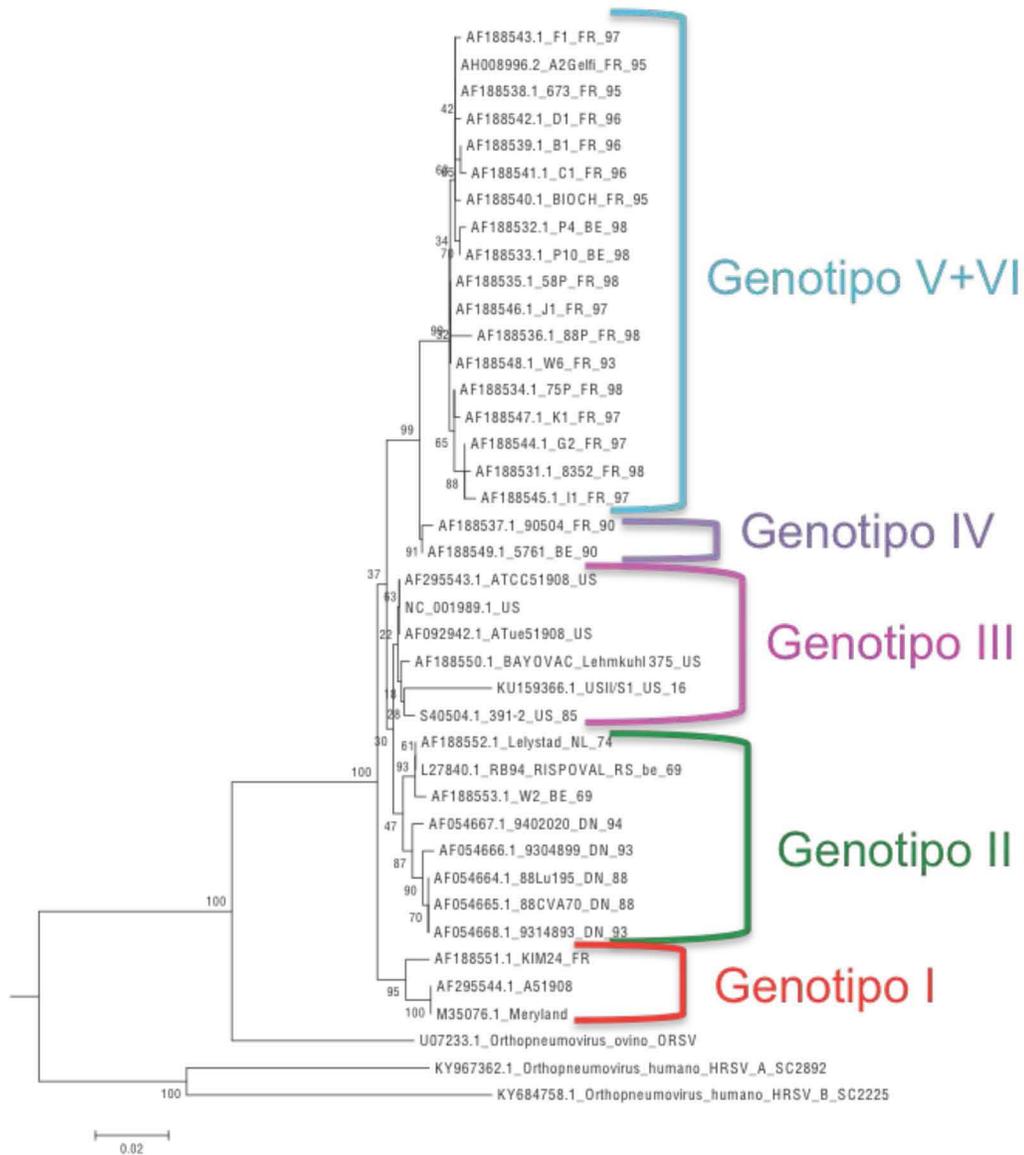


Figura 20. Árbol filogenético de las secuencias reportadas de GenBank para la nucleoproteína N.

### 6.6.2. Árbol filogenético de las secuencias de la nucleoproteína N obtenidas de los aislamientos.

**Alineamiento.** Para alinear y hacer la reconstrucción filogenética de la nucleoproteína, se utilizaron 24 secuencias de las cuales 11 son las obtenidas en este trabajo, uno de *O. ovino* y dos de *O. humano* del subgrupo antigénico A y B que se tomaron como grupo externo, y el resto secuencias reportadas del GenBank como se muestra en la figura 21.

**Reconstrucción filogenética.** Se utilizó el método neighbor joining, un modelo de sustitución Tamura Nei, con un valor de Bootstrap de 1000. Como se observa en la figura 21. Las secuencias obtenidas se marcan con una estrella y se agrupan con secuencias del genotipo III.

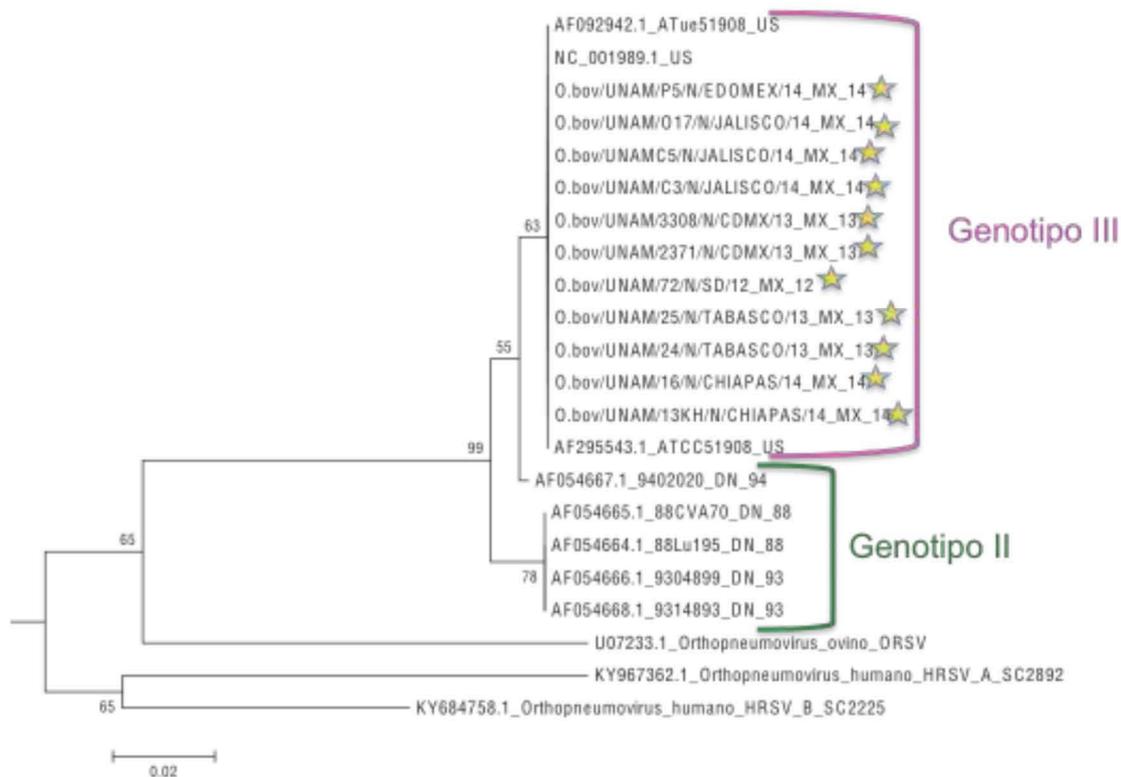


Figura 21. Árbol filogenético de las secuencias de la nucleoproteína N obtenidas de los aislamientos.

## 6.7. Reconstrucción filogenética para glicoproteína G en nucleótidos.

### 6.7.1 Árbol filogenético de 197 secuencias de la glicoproteína G reportadas en GenBank, incluyendo aislamientos mexicanos.

**Alineamientos.** Para G se utilizaron 197 secuencias de las cuales 6 son las obtenidas en este trabajo y 1 de *O. ovino* y 2 de *O. humano* del subgrupo antigénico A y B que se tomaron como grupo externo. Se alinearon con Clustal W.

**Reconstrucción filogenética.** Se utilizó el método neighbor joining, con un modelo de sustitución Tamura de 3 parámetros, con un valor de Bootstrap de 1000. En la figura 22 se muestra un acercamiento del grupo donde se encuentran las secuencias obtenidas, que corresponden al genotipo III, junto con las Estadounidenses. En la figura 23 se observa el árbol filogenético completo.

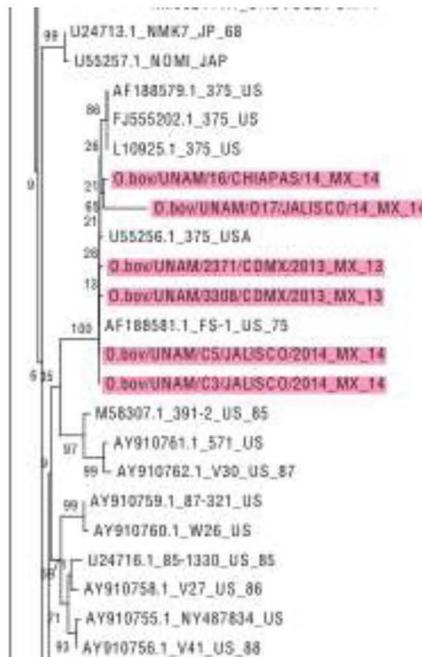


Figura 22. Genotipo III de la glicoproteína G (de la figura 23).

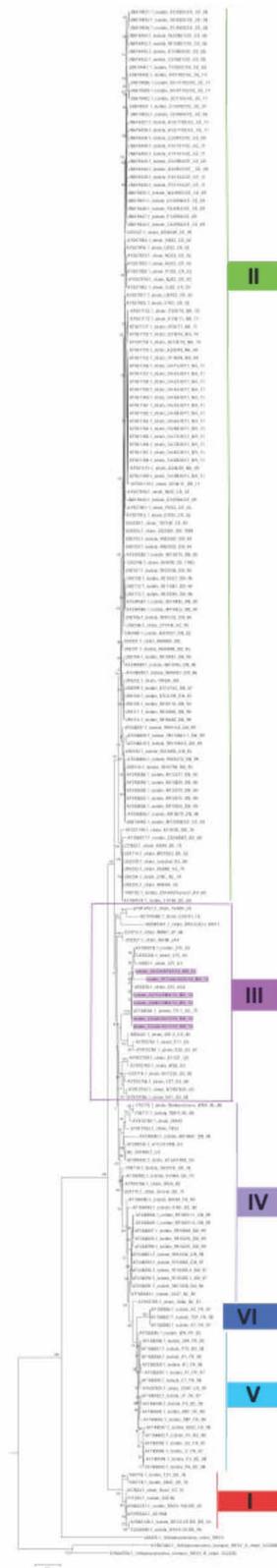


Figura 23. Árbol filogenético de 197 secuencias de G reportadas en GenBank, incluyendo aislamientos mexicanos.

**6.7.2. Árbol filogenético de 28 secuencias representativas de la glicoproteína G reportadas en GenBank, incluyendo aislamientos mexicanos.**

**Alineamiento.** Se alinearon con Clustal W 28 secuencias, de las cuales 19 son representativas de cada genotipo y 6 son las obtenidas en este trabajo, como se muestra en el cuadro 5, estos mismos aislamientos se utilizaron para comparar secuencias a nivel de aminoácidos, además para el árbol filogenético se tomaron como grupo externo uno de *O. ovino* y dos de *O. humano* del subgrupo antigénico A y B.

**Reconstrucción filogenética.** Se utilizó el método maximum likelihood, un modelo de sustitución HKY, con un valor de Bootstrap de 1000, como se observa en la figura 24. En este árbol se observan las secuencias obtenidas marcadas con una estrella dentro del genotipo III.

III (A)	AF188579.1 _375_US AF188581.1 _FS-1_US_75 AY910755.1 _NY48784_US_05
I (B)	U57823.1 _BOVX AF295544.1_A51908_Maryland Y08718.1 _4642_UK_76
II (AB)	U92100.1 _87LU195_DN_87 U55247.1 _4556sw U92112.1 _9511581_DN_95
IV (A) (AB)	Y08719.1 _SNOOK_UK_76 U24715.1 _Dorset_UK_71 AY910766.1 _WE6
IV(sin clasificar)	Y08717.1 _WBH_NL_86
V	AF188604.1 _88P_FR_98 AF188600.1 _P6_BE_98 AF188592.1 _J1_FR_97
VI	AF188586.1 _K2_FR_97 AF188587.1 _75P_FR_98 AF188585.1 _K1_FR_97

Cuadro 6. Secuencias representativas de cada genotipo de la proteína G.

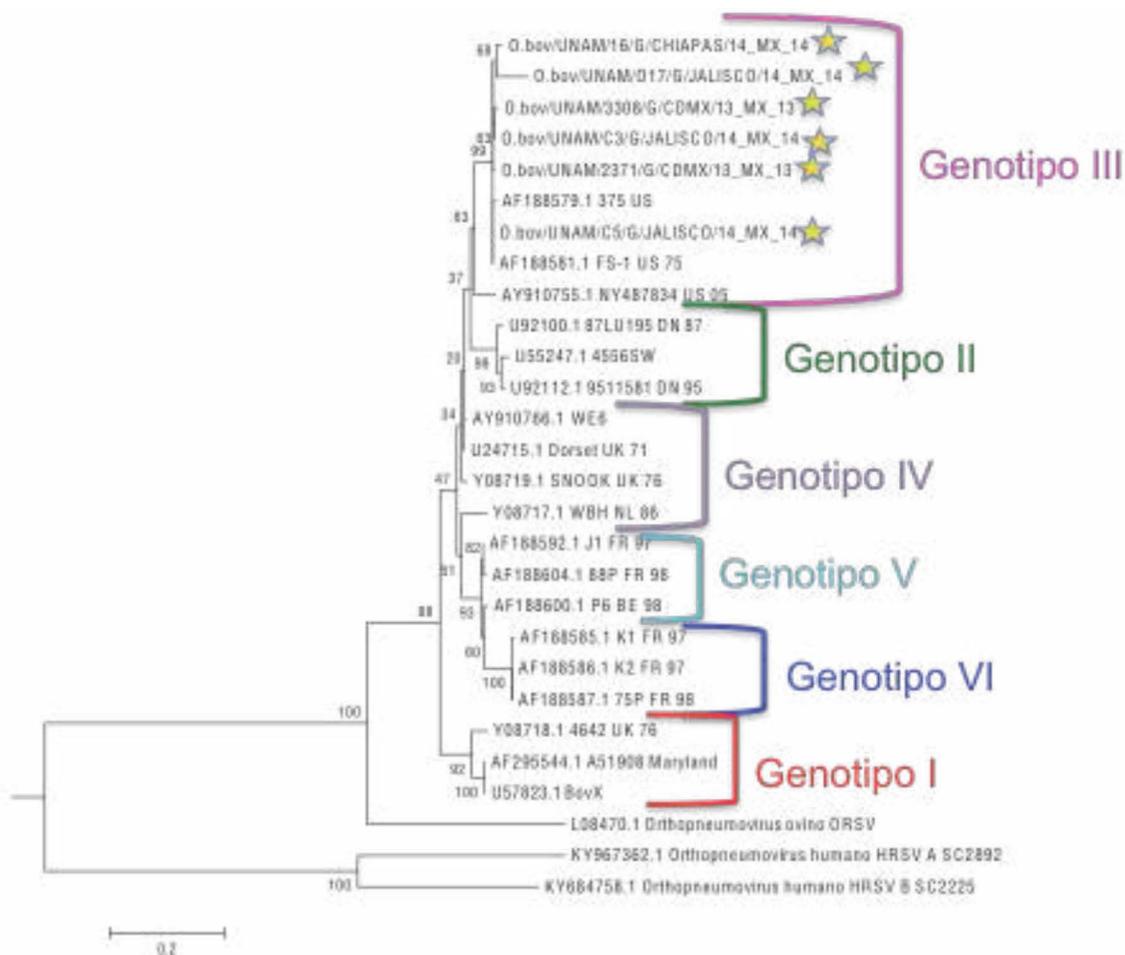


Figura 24. Árbol filogenético de 28 secuencias representativas de la glicoproteína G, incluyendo aislamientos mexicanos.

## 6.8. Reconstrucción filogenética de la glicoproteína G en aminoácidos.

### 6.8.1. Árbol filogenético de 28 secuencias representativas de la glicoproteína G reportadas en GenBank, incluyendo aislamientos mexicanos a nivel de aminoácidos.

**Reconstrucción filogenética.** Se realizó utilizando la secuencia de aminoácidos, la alineación se llevó a cabo con MUSCLE, y se utilizó el método maximum likelihood, un modelo de sustitución HKY, con un valor de Bootstrap de 1000. Nuevamente las secuencias obtenidas, se localizan dentro del genotipo III y se marcan con una estrella en la figura 25.

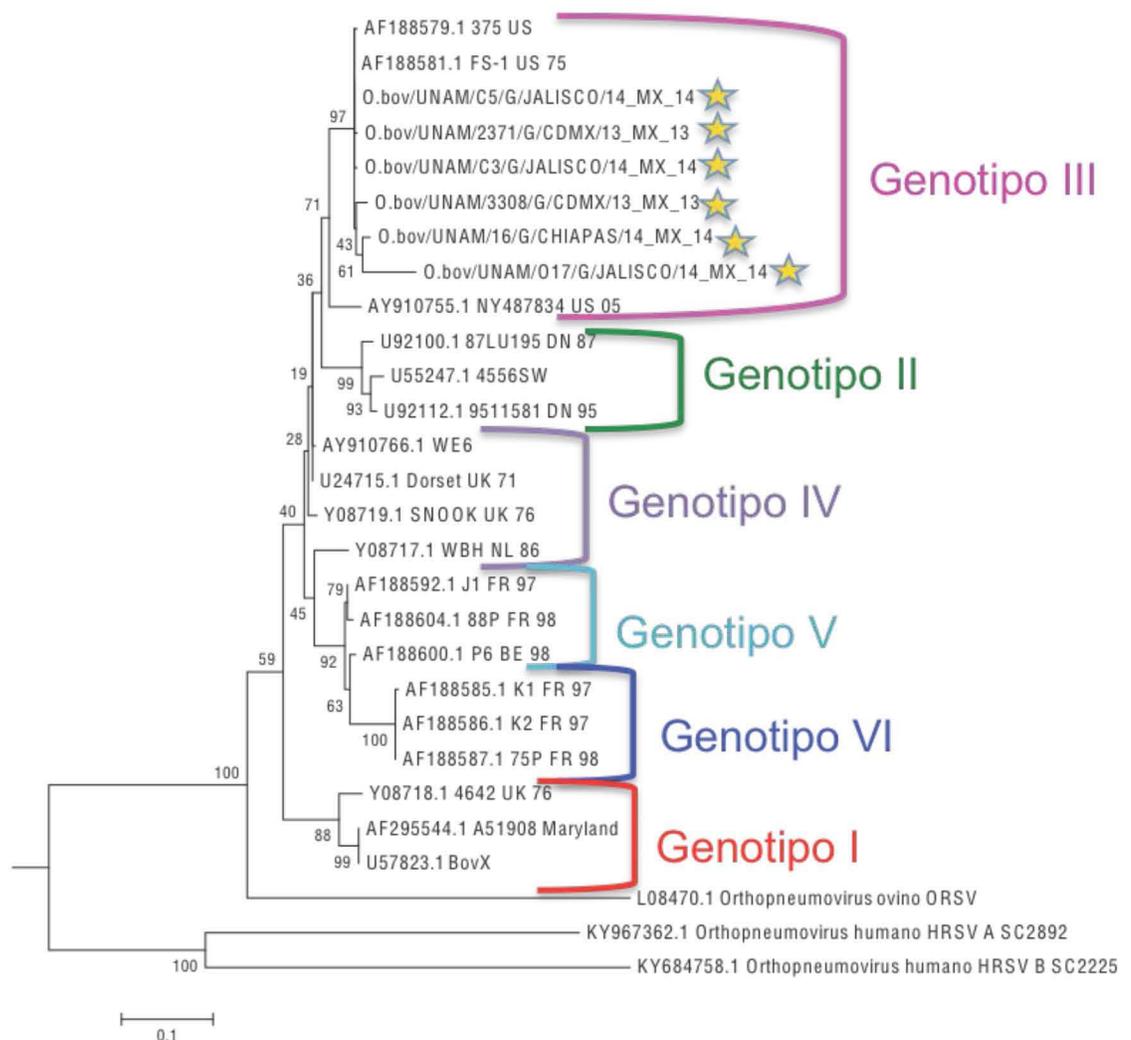


Figura 25. Árbol filogenético de 28 secuencias representativas de la glicoproteína G reportadas en GenBank, incluyendo aislamientos mexicanos a nivel de aminoácidos

### 6.9. Análisis de la Comparación entre las secuencias de aminoácidos.

Se compararon del aminoácido 170 al 209, debido a que entre estos sitios se encuentran los cambios de aminoácidos mas importantes para la glicoproteína G, tomando como referencia los reportes de Valarcher en el 2000 y Langedijk en el 1997.

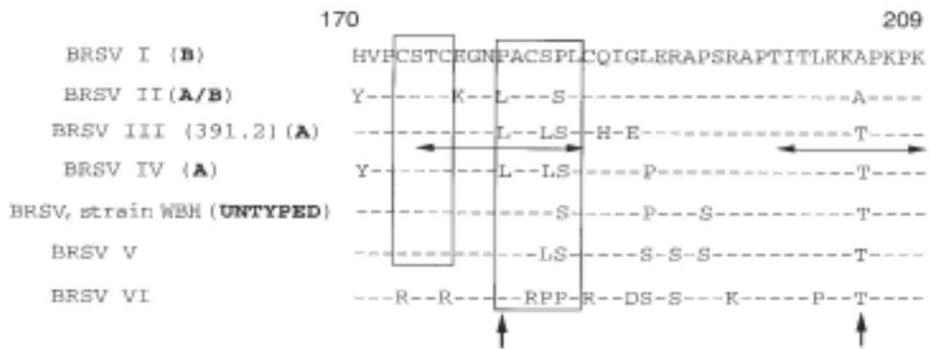


Figura 26. Comparación de secuencias de aa. Tomada de Valarcher *et al.*, 2000.

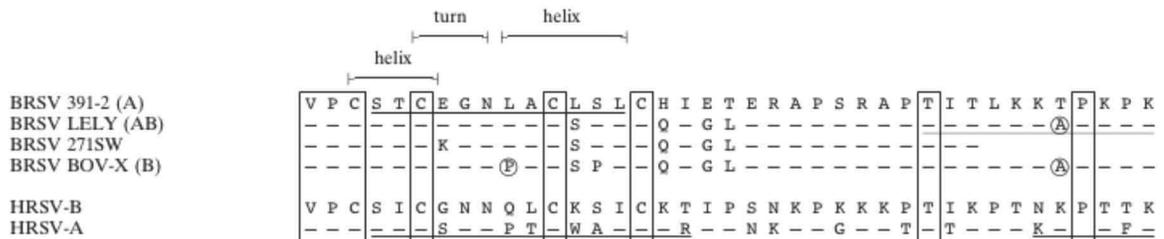


Figura 27. Comparación de secuencias de aa. Tomada de Langedijk, J. P. *et al.*, 1997

La secuencia consenso fue BovX, y se añadieron 3 secuencias de los grupos externos, O ovino (ORSV) y O humano (HRSV) subgrupo antigénico A cepa SC2892 y B cepa SC2225.



Figura 28. Secuencias de aminoácidos reportadas y obtenidas.

En color rosa el ectodominio central conservado de 13 residuos, las líneas en color rojo indican las posiciones 173, 176, 182 y 186 de cisteínas, en ellas se observa un cambio de (C) Cys por (R) Arg en las secuencias K1, K2 y 75P dichas secuencias se encuentran dentro del genotipo VI, las líneas en verde indican el nudo de cisteína, donde se formarían los dos puentes disulfuro entre Cys-173 y Cys-186 (puente exterior) y entre Cys-176 y Cys-182 (puente interior), aquí comienza una vuelta de hélice Cys173-Cys176 que corre en paralelo al giro de 1.5 alfa hélice formado por Leu180-Leu185. Las dos hélices están unidas por un giro de tipo I Cys176-Asn179. La asparagina (N) 179 está implicada en tres enlaces de hidrógeno. Justo en el aminoácido 180 hay una variación, L para las secuencias 87LU195, 4556sw y 9511581 del genotipo II (AB), SNOOK y Dorset del genotipo IV (A), todas las secuencias del genotipo III incluyendo las secuencias obtenidas en este trabajo, y (P) Pro para el resto de los genotipos, esta variación se marca con una flecha color turquesa.

También se observa la región inmunodominante, una secuencia de aminoácidos CEGNPAC entre Cys-176 y Cys-182, región importante para la unión de anticuerpos, en ella se percibe un cambio en la posición 177 de (E) ácido glutámico por (K) Lys para las secuencias de 87LU195, 4556sw y 9511581 del genotipo II (AB), correspondiente a la superficie antigénica.

En color amarillo se encierra la región de quimiocina CX3C llamada fractalina, entre las posiciones 182 y 186, donde hay cambios en la posición 183 de (S) Ser por (L) Leu para los genotipos V y IV menos para WBH (antigénicamente sin clasificación), y por (P) Pro para el genotipo VI. Se registra otro cambio en el aminoácido 184 de (P) Pro por (S) Ser para los genotipos II, IV, V y III, relacionado con la estructura.

En la posición 205 de (A) Ala por (T) Thr para los genotipos IV, V, VI y III, marcando una modificación en un sitio de O-glicosilación, este cambio se indica con una flecha color morado.

Estos cambios que se presentaron, pueden producir modificaciones en la estructura tridimensional del bucle interno en la región hidrofóbica central, los cuales se pueden observar en la siguiente imagen, donde se esquematiza en la superficie el nudo de cisteína, el epítipo se marca color rojo en la superficie, y se indican los cambios de aminoácidos antes mencionados.

Los datos presentados coinciden con los reportados por Valarcher en el 2000 y Langedijk en el 1997. La región central hidrofóbica de la proteína G, situada entre las dos regiones de tipo mucina y que comprende las posiciones de aminoácidos 154 a 192, ha permanecido altamente estable durante la evolución. Esta región acepta mutaciones predominantemente sinónimas. La región que podría interactuar con el receptor de células.

Según las secuencias obtenidas agrupadas en el genotipo III, la estructura sería igual a la siguiente imagen, tomada de Langedijk en el 1997.

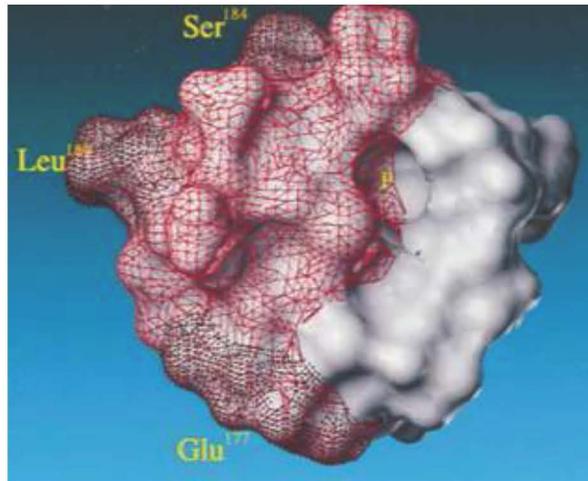


Figura 29. Cambios en el nudo de cisteína.

En la siguiente imagen se muestra en color azul las vueltas en hélice del nudo de cisteína, en rojo el giro de Leu y la región N y C-terminal, en amarillo los puentes de disulfuro unidos a las cuatro cys, tomada de Langedijk en el 1997.

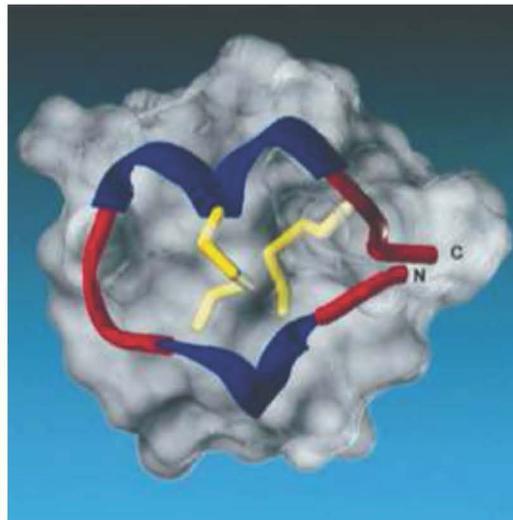


Figura 30. Nudo de Cisteína de la proteína G.

## 7. Discusión.

El uso de la detección de anticuerpos para el diagnóstico de la infección del Orthopneumovirus bovino en suero o leche tiene su desventaja, ya que los animales permanecen positivos durante varios años, los terneros calostrados de vacas seropositivas también serán positivos (Baker *et al.*, 1986, Uttenthal *et al.*, 1996), además de que, los métodos serológicos tienen baja especificidad. El método ideal es el aislamiento. Sin embargo, el periodo de viremia en los animales infectados es muy corto, eliminan el virus durante un corto periodo de tiempo, lo cual hace que detectar el Orthopneumovirus bovino sea complicado (Sacco *et al.*, 2014, Larsen *et al.*, 1999). Lo anterior explicaría la alta prevalencia reportada por serología y la detección del antígeno en poca proporción que obtuvimos en este trabajo, lo cual no quiere decir que el O. bovino esté presente en menos proporción que los otros virus del CRB, si no que tal vez sea difícil detectarlo así como aislarlo. En este trabajo a pesar de haber obtenido 13 muestras positivas, sólo 11 pudieron ser aisladas, se sugiere que esto puede ser debido a varios factores por ejemplo el traslado al laboratorio pudo no ser oportuno, otra razón podrían ser las coinfecciones de otros agentes virales en las muestras, provocando un efecto citopático que no le permitiera terminar la replicación, incluso provocando muerte celular, interfiriendo con el aislamiento del Orthopneumovirus bovino por diferencias en el tiempo de crecimiento dado que el O. bovino es un virus de lento crecimiento. Las muestras positivas que se utilizaron para el aislamiento fueron de pulmón y oreja, se sugiere que posiblemente los animales estaban en viremia al tomar la muesca de oreja, y que el virus podría estar en circulación, desafortunadamente no se tenía muestra de sangre completa, no sugerimos que fuera por persistencia ya que no existe evidencia bibliográfica que lo compruebe, pero la decisión de tomar dichas muestras fue por las coinfecciones que potencializan las infecciones con otros agentes.

El uso de las técnicas moleculares han permitido el análisis en mayor detalle de la información de las secuencias, lo que también podría ayudar a entender los patrones de infección. La información obtenida podría ayudar en el diseño y aplicación de medidas encaminadas a prevenir la transmisión del Orthopneumovirus bovino (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012). El uso de RT-PCR multiplex en este trabajo nos ayudó a detectar el virus y a encontrar coinfecciones con otros agentes virales.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con reportes de coexistencia de diferentes especies virales en un mismo hato y en un mismo animal. La coexistencia también se ha demostrado en estudios de población con la existencia de variantes virales en aislados clínicos, que dan lugar a la presencia de quasiespecies (Deplanche *et al.*, 2007).

La existencia de diversos genotipos de Orthopneumovirus bovino y su relación genética, ayuda a comprender la base molecular de su historia genética, enfoques que han sido particularmente útiles para estudiar los orígenes y la evolución del Orthopneumovirus bovino (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012).

Los datos obtenidos acerca de los linajes virales que circulan en la población ayudarán a mostrar cual es el estatus del O.bovino en el país, ya que solo existían reportes por serología (Solis-Calderon *et al.*, 2007, Cordova-Izquierdo, 2009, Figueroa-Chavez *et al.*, 2012). En este trabajo además de la detección se logró identificar que el genotipo circulante en los estados de Jalisco, Ciudad de México, Chiapas, Tabasco y Estado de México, corresponde al III, dicho genotipo esta reportado en USA (Valarcher *et al.*, 2000). De acuerdo a las reconstrucciones filogenéticas obtenidas concuerdan con los reportes de la disposición geográfica del virus (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012, Bidokhti *et al.*, 2012, Spilki *et al.*, 2006, Klem *et al.*, 2014, Socha, 2009), esta distribución es un mecanismo que no está bien establecido, puede estar dado por varios factores.

Conocer el genotipo de los virus que circulan en el país, podría ser una herramienta para la vacunación, se podrían usar los aislamientos para fabricar vacunas locales, y conocer la secuencia podría ayudar a la fabricación de vacunas modernas como VLP (Virus Like Particle).

A pesar de que sólo existe un serotipo, la preocupación de estudiar el O. bovino radica en las mutaciones que pueden estar presentes, por ello uno de nuestros objetivos fue determinar el virus que circula en algunas poblaciones de bovinos el estudio principalmente en la glicoproteína G (Valarcher *et al.*, 2000, Martinez and Melero, 2000).

Las mutaciones en la parte central conservada del ectodominio de la glicoproteína G resultan en la pérdida de cuatro residuos de Cys y en la supresión de dos puentes disulfuro y una hélice, en algunos aislados de campo, una o varias de las cisteínas se mutan a arginina (R), alanina (A) o una asparagina (N) (Spilki *et al.*, 2006, Langedijk *et al.*, 1997).

Los datos presentados indican que dependiendo del genotipo se asocia el subgrupo antigénico. Las variaciones entre las secuencias de aminoácidos producen cambios conformacionales a la estructura de la proteína, esto es importante como mecanismo de evasión del sistema inmune, estos datos son importantes porque a pesar de que las secuencias del genotipo III no presentan cambios en las cuatro Cys, si presentan cambios en Glu 177 y Leu 180 (cambios en la superficie antigénica), Ser 184 (en la estructura) y Thr 205 (en el sitio de O-glicosilación). Esto se debe de tomar en cuenta para escoger la cepa del virus utilizado para la vacunación, aunque exista un serotipo. Los datos presentados también sirven para conocer la epidemiología molecular del virus. De acuerdo con todo lo anterior las cepas viejas europeas del genotipo VI presentan el cambio importante en las Cys y tienen cierto parecido a las cepas del genotipo I, de los años 70's. Las cepas del genotipo IV y V son parecidas que corresponden a las europeas recientes, el genotipo III tienen cierto parecido con las europeas recientes. Y el genotipo II es diferente por que presenta la variación en el sitio de O-glicosilación. Los datos obtenidos pueden ser útiles para la formulación de vacunas de subunidades, enfocadas a la región central, pero se debe seguir investigando y tener cuidado por las mutaciones que se presentan.

Actualmente el uso de vacunas sólo hace que los signos clínicos disminuyan, pero no son efectivas para la protección contra la infección (Meyer *et al.*, 2008). Esto tiene como consecuencia que a pesar de la vacunación se sigan teniendo pérdidas económicas en la industria ganadera, junto con la preocupación de que las vacunas pueden revertir y producir enfermedad.

Las vacunas que se han utilizado a nivel mundial contienen las cepas Lenhmkuhl 375/BAYOVAC® vacuna atenuada del genotipo III de US 1979, Lelystad y 220-69/VACORES® genotipo II cepas viejas de Países Bajos de 1986 y Bélgica de 1969, RB-94/RISPOVAL® del genotipo II Bélgica de 1975. En México las vacunas que se aplican son de virus inactivado y vacunas de virus vivo modificado atenuadas por pases en cultivo celular, pero no indica el tipo de cepa que utilizan. Además dichas vacunas por lo general vienen combinadas con otros agentes del CRB, tanto virales como bacterianos.

A pesar de los datos obtenidos y los reportados tanto para el Orthopneumovirus bovino como para los otros virus del CRB, debido a que no aparecen todos los informes de la constitución de las vacunas, es difícil escoger un programa adecuado. Además, se debe tener cuidado con la aplicación de vacunas inactivadas que pudieran exacerbar la presentación de signos clínicos en la infección con cepas de campo y con las vacunas de virus vivo modificado que son ineficaces.

La hipótesis que nos planteamos al principio se acepta, debido a que se cumplió con la identificación de las variantes que circulan en el país, gracias a que se pudo realizar la secuenciación de la proteína más variable y se pudo realizar la genotipificación al Orthopneumovirus bovino, gracias a que también se cumplió con el aislamiento.

## **8. Conclusión.**

En conclusión, se pudo detectar el virus sincitial respiratorio bovino, de animales con signos clínicos de enfermedad respiratoria, complementando los datos serológicos antes publicados (Solis-Calderon *et al.*, 2007, Cordova-Izquierdo, 2009, Figueroa-Chavez *et al.*, 2012), comprobando la circulación del virus en el país. Además de detectar coinfecciones con otros virus del CRB.

Se realizó el aislamiento viral en cultivo celular de 11 de 13 muestras positivas. Se obtuvieron 11 secuencias parciales de la nucleoproteína N y 6 secuencias parciales de la glicoproteína G del Orthopneumovirus bovino, se pudo realizar la reconstrucción filogenética tanto de N como de G, encontrando el genotipo circulante en 5 estados del país: Jalisco, Tabasco, Ciudad de México, Chiapas y Estado de México. Dichas secuencias se agrupan en genotipo III, que se ha reportado en Estados Unidos.

## 9. Lista de Abreviaturas.

O. bovino (BRSV)	Orthopneumovirus bovino
O. humano (HRSV)	Orthopneumovirus humano
O. ovino (ORSV)	Orthopneumovirus ovino
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
CRB	Complejo Respiratorio Bovino
VDVB	Virus de la Diarrea Viral Bovina
PI3	Virus de la parainfluenza 3 bovina (Respirovirus bovino 3)
HVB-1	Herpes virus bovino 1 (Alpha herpesvirus bovino 1)
%	Porcentaje
>	Mayor que
\$	Pesos
° C	Grados Centígrados
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minuto
g	Gramos
µl	Microlitros
nm	nanometros
kb	kilobases
FWD	Forward
RVS	Reverse
G	Glicoproteína
F	Proteína de Fusión
SH	Proteína Pequeña Hidrófoba
M	Proteína Matriz
M2-1	Proteína M2-1
M2-2	Proteína M2-2
N	Nucleoproteína
P	Fosfoproteína
L (RdRp)	ARN polimerasa dependiente de ARN viral
NS1	No estructural 1
NS2	No estructural 2
ADN	Ácido Ribonucleico

ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
GS	Gene-Start
GE	Gene-End
ORF	Open Reading Frame (Marco de Lectura abierto)
IFN $\alpha/\beta$	Interferón alfa/beta
IRF-3	Proteína quinasa
AKT	Factor regulador de IFN 3
ARNdc	Ácido Ribonucleico de doble cadena
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated protein 5
PKR	Protein kinase R
TNF-a	Factor de necrosis tumoral
Th1	Linfocitos T helper 1
Th2	Linfocito T helper 2
GV	Forma anclada/asociada
Gs	Soluble/secretada
GAG	Glicosaminoglicanos
HAE	Cultivos de células
CXC3	Quimiocina fractalina
CX3CR1	Receptor a Quimiocina fractalina
CD62L	L-selectina
GSK-3	$\beta$ glucosa sintetasa quinasa
PP2A	Proteína fosfatasa 2 <sup>a</sup>
RNP	Ribonucleoproteína
TLR4	Toll-like receptor 4
RT-PCR	Retrotranscripción- Reacción en Cadena de la Polimerasa
pb	Pares de bases
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
TAE	Tris, acetato y EDTA
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney
ATCC	American Type Culture Collection

DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
SFB	Suero Fetal Bovino
VLP	Virus Like Particle/Partículas Similares a Virus
CDMX	Ciudad de México
MX	México
EDOMEX	Estado de México
s/d	Sin Dato
US	Estados Unidos de América
SE	Suecia
CR	Republica Checa
NR	Noruega
DN	Dinamarca
BE	Bélgica
NL	Países Bajos
UK	Reino Unido
FR	Francia
BR	Brasil
JP	Japón
HKY	Hasegawa- Kishino-Yano
nt	Nucleótido
aa	Aminoácidos
Arg (R)	Arginina
Ala (A)	Alanina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Asn (N)	Asparagina
Ser (S)	Serina
Thr (T)	Tronina
Pro (P)	Prolina
Cys (C)	Cisteina
Glu (E)	Ácido glutámico
Gly (G)	Glicina

## **10. Índice de cuadros.**

Cuadro 1. Proteínas del BRSV.	5
Cuadro 2. Datos del muestreo.	30
Cuadro 3. Muestras positivas obtenidas por estado.	39
Cuadro 4. Aislamientos obtenidos.	46
Cuadro 5. Diferencias de los sitios de las secuencias de N.	47
Cuadro 6. Secuencias representativas de cada genotipo de la proteína G.	51

## **11. Índice de Figuras.**

Figura 1. Transcripción, traducción y replicación del O. bovino.	2
Figura 2. Esquema del Orthopneumovirus bovino.	3
Figura 3. Mapa genético del Orthopneumovirus humano.	4
Figura 4. Esquemización de la proteína de fusión.	8
Figura 5. Esquema de la proteína G.	11
Figura 6. Segmentos de la glicoproteína G del Orthopneumovirus humano.	11
Figura 7. Árboles filogenéticos de G, F y N.	19
Figura 8. Representación de las mutaciones en el nudo de cys.	20
Figura 9. Pulmón con lesiones craneoventrales.	37
Figura 10. Gel con aislamientos positivos al CRB.	38
Figura 11. Gel con aislamientos positivos al CRB.	39
Figura 12. Control negativo de cultivo celular sin infectar.	40
Figura 13. Control positivo de cultivo celular con el virus 375.	40
Figura 14. Pase A de la muestra 3308.	41
Figura 15. Pase B de la muestra 3308.	41

Figura 16. Gel coA los productos del CRB por separado de los aislamientos.	42
Figura 17. Total de aislamientos de <i>O. bovis</i> por estados.	43
Figura 18. Gel coA productos de la Aucleoproteína N proveídos de los aislamientos.	44
Figura 19. Productos amplificados de la glicoproteína G proveídos de los aislamientos.	45
Figura 20. Árbol filogenético de las secuencias reportadas de GeABaK para la Aucleoproteína N.	47
Figura 21. Árbol filogenético de las secuencias de la Aucleoproteína N obtenidas de los aislamientos	48
Figura 22. Geotipo III de la proteína G (de la figura 23).	49
Figura 23. Árbol filogenético de 197 secuencias de G reportadas eA GeABaK, incluido aislamiento mexicano.	50
Figura 24. Árbol filogenético de 28 secuencias representativas de G, incluido aislamiento mexicano.	52
Figura 25. Árbol filogenético de 28 secuencias representativas de la glicoproteína G reportadas eA GeABaK, incluido aislamiento mexicano a nivel de aminoácidos	53
Figura 26. Comparación de secuencias de aa Valarcher, 2000.	54
Figura 27. Comparación de secuencias de aa LaAgedijk, J. P., 1997.	54
Figura 28. Secuencias de aminoácidos reportadas y obtenidas.	55
Figura 29. Cambios eA el Audo de cisteína.	57
Figura 30. Nudo de Cisteína de la proteína G.	57

## 12. Referencias.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV).

[Página en Internet] 2017 [Visitado 2017 Mayo 26]; [2 pantallas aproximadamente].  
Disponible en URL: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=20161068](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20161068)

- AGUIRRE, A. A., HANSEN, D. E., STARKEY, E. E., & MCLEAN, R. G. 1995. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 21, 313-322.
- ALANSARI, H. & POTGIETER, L. N. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of the phosphoprotein, nucleocapsid protein, matrix protein and 22K (M2) protein of the ovine respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, 75 ( Pt 12), 3597-601.
- AMES, T. R. 1993. The epidemiology of BRSV infection. *Vet. Med*, 88, 881-885.
- ARSLANAGIC, E., MATSUMOTO, M., SUZUKI, K., NEROME, K., TSUTSUMI, H. & HUNG, T. 1996. Maturation of respiratory syncytial virus within HEp-2 cell cytoplasm. *Acta Virol*, 40, 209-14.
- ASENJO, A., CALVO, E. & VILLANUEVA, N. 2006. Phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein at threonine 108 controls its interaction with the M2-1 protein in the viral RNA polymerase complex. *J Gen Virol*, 87, 3637-42.
- ASENJO, A., GONZALEZ-ARMAS, J. C. & VILLANUEVA, N. 2008. Phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein at serine 54 regulates viral uncoating. *Virology*, 380, 26-33.
- ASENJO, A., RODRIGUEZ, L. & VILLANUEVA, N. 2005. Determination of phosphorylated residues from human respiratory syncytial virus P protein that are dynamically dephosphorylated by cellular phosphatases: a possible role for serine 54. *J Gen Virol*, 86, 1109-20.
- ATREYA, P. L., PEEPLES, M. E. & COLLINS, P. L. 1998. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J Virol*, 72, 1452-61.
- BAKER, J. C., AMES, T. R. & MARKHAM, R. J. 1986. Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd. *Am J Vet Res*, 47, 240-5.
- BARIK, S. 1993. The structure of the 5' terminal cap of the respiratory syncytial virus mRNA. *J Gen Virol*, 74 ( Pt 3), 485-90.

- BERMINGHAM, A. & COLLINS, P. L. 1999. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11259-64.
- BIDOKHTI, M. R., TRAVEN, M., OHLSON, A., ZARNEGAR, B., BAULE, C., BELAK, S., ALENIUS, S. & LIU, L. 2012. Phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial viruses from recent outbreaks in feedlot and dairy cattle herds. *Arch Virol*, 157, 601-7.
- BLODORN, K., HAGGLUND, S., FIX, J., DUBUQUOY, C., MAKABI-PANZU, B., THOM, M., KARLSSON, P., ROQUE, J. L., KARLSTAM, E., PRINGLE, J., ELEOUE, J. F., RIFFAULT, S., TAYLOR, G. & VALARCHER, J. F. 2014. Vaccine safety and efficacy evaluation of a recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV) with deletion of the SH gene and subunit vaccines based on recombinant human RSV proteins: N-nanorings, P and M2-1, in calves with maternal antibodies. *PLoS One*, 9, e100392.
- BOSSERT, B. & CONZELMANN, K. K. 2002. Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. *J Virol*, 76, 4287-93.
- BOSSERT, B., MAROZIN, S. & CONZELMANN, K. K. 2003. Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*, 77, 8661-8.
- BRODERSEN, B. W. 2010. Bovine respiratory syncytial virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26, 323-33.
- BUCHHOLZ, U. J., FINKE, S. & CONZELMANN, K. K. 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol*, 73, 251-9.
- CALDOW, G. L., EDWARDS, S., NIXON, P. & PETERS, A. R. 1988. Associations between viral infection and respiratory disease in young beef bulls. *Vet Rec*, 122, 529-31.
- CARTEE, T. L. & WERTZ, G. W. 2001. Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection. *J Virol*, 75, 12188-97.

- COLLINS, P. L., HILL, M. G., CAMARGO, E., GROSFELD, H., CHANOCK, R. M. & MURPHY, B. R. 1995. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11563-7.
- COLLINS, P. L., HILL, M. G., CRISTINA, J. & GROSFELD, H. 1996. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 81-5.
- COLLINS, P. L., HILL, M. G. & JOHNSON, P. R. 1990. The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J Gen Virol*, 71 ( Pt 12), 3015-20.
- COLLINS, P. L. & MOTTET, G. 1991. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, 72 ( Pt 12), 3095-101.
- COLLINS, P. L., OLMSTED, R. A., SPRIGGS, M. K., JOHNSON, P. R. & BUCKLER-WHITE, A. J. 1987. Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 5134-8.
- COLLINS, P. L. & WERTZ, G. W. 1983. cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3208-12.
- CORDOVA-IZQUIERDO, A., CORDOVA-JIMÉNEZ, C. A., CORDOVA-JIMÉNEZ, M. S., RUIZ LANG, C. G., SALTIJERAL OAXACA, J. A., XOLALPA CAMPOS, V. M., ... & ARANCIBIA SALINAS, K. 2009. Seroprevalence of viral diseases in cattle meat producer under humid tropical conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3, 4067-4070.
- COSTA, M., GARCIA, L., YUNUS, A. S., ROCKEMANN, D. D., SAMAL, S. K. & CRISTINA, J. 2000. Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uruguay. *Vet Res*, 31, 241-6.
- COWTON, V. M., MCGIVERN, D. R. & FEARNIS, R. 2006. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol*, 87, 1805-21.

- CUESTA, I., GENG, X., ASENJO, A. & VILLANUEVA, N. 2000. Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J Virol*, 74, 9858-67.
- DE JONG, M. C., VAN DER POEL, W. H., KRAMPS, J. A., BRAND, A. & VAN OIRSCHOT, J. T. 1996. Quantitative investigation of population persistence and recurrent outbreaks of bovine respiratory syncytial virus on dairy farms. *Am J Vet Res*, 57, 628-33.
- DEPLANCHE, M., LEMAIRE, M., MIRANDETTE, C., BONNET, M., SCHELCHER, F. & MEYER, G. 2007. In vivo evidence for quasispecies distributions in the bovine respiratory syncytial virus genome. *J Gen Virol*, 88, 1260-5.
- DUPUY, L. C., DOBSON, S., BITKO, V. & BARIK, S. 1999. Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser(215) and is without effect. *J Virol*, 73, 8384-92.
- ELVANDER, M. 1996. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Rec*, 138, 101-5.
- EVANS, J. E., CANE, P. A. & PRINGLE, C. R. 1996. Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res*, 43, 155-61.
- FEARNS, R. & COLLINS, P. L. 1999. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol*, 73, 5852-64.
- FELDMAN, S. A., CRIM, R. L., AUDET, S. A. & BEELER, J. A. 2001. Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F, G and SH form an oligomeric complex. *Arch Virol*, 146, 2369-83.
- FELDMAN, S. A., HENDRY, R. M. & BEELER, J. A. 1999. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol*, 73, 6610-7.
- FIGUEROA-CHAVEZ, D., SEGURA-CORREA, J. C., GARCIA-MARQUEZ, L. J., PESCADOR-RUBIO, A. & VALDIVIA-FLORES, A. G. 2012. Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. *Trop Anim Health Prod*, 44, 1417-21.

- FURZE, J. M., ROBERTS, S. R., WERTZ, G. W. & TAYLOR, G. 1997. Antigenically distinct G glycoproteins of BRSV strains share a high degree of genetic homogeneity. *Virology*, 231, 48-58.
- GADDUM, R. M., COOK, R. S., FURZE, J. M., ELLIS, S. A. & TAYLOR, G. 2003. Recognition of bovine respiratory syncytial virus proteins by bovine CD8+ T lymphocytes. *Immunology*, 108, 220-9.
- GERSHWIN, L. J. 2007. Bovine respiratory syncytial virus infection: immunopathogenic mechanisms. *Anim Health Res Rev*, 8, 207-13.
- GERSHWIN, L. J. 2012. Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 35, 253-7.
- GERSHWIN, L. J., GUNTHER, R. A., HORNOF, W. J. & LARSON, R. F. 2008. Effect of infection with bovine respiratory syncytial virus on pulmonary clearance of an inhaled antigen in calves. *Am J Vet Res*, 69, 416-22.
- GHILDYAL, R., BAULCH-BROWN, C., MILLS, J. & MEANGER, J. 2003. The matrix protein of Human respiratory syncytial virus localises to the nucleus of infected cells and inhibits transcription. *Arch Virol*, 148, 1419-29.
- GONZALEZ-REYES, L., RUIZ-ARGUELLO, M. B., GARCIA-BARRENO, B., CALDER, L., LOPEZ, J. A., ALBAR, J. P., SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. & MELERO, J. A. 2001. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9859-64.
- GOULD, P. S. & EASTON, A. J. 2005. Coupled translation of the respiratory syncytial virus M2 open reading frames requires upstream sequences. *J Biol Chem*, 280, 21972-80.
- GRIFFIN, D. 1997. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 13, 367-77.
- GULLIKSEN, S. M., JOR, E., LIE, K. I., LOKEN, T., AKERSTEDT, J. & OSTERAS, O. 2009. Respiratory infections in Norwegian dairy calves. *J Dairy Sci*, 92, 5139-46.
- HAGGLUND, S., SVENSSON, C., EMANUELSON, U., VALARCHER, J. F. & ALENIUS, S. 2006. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. *Vet J*, 172, 320-8.

- HALLAK, L. K., SPILLMANN, D., COLLINS, P. L. & PEEPLES, M. E. 2000. Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. *J Virol*, 74, 10508-13.
- HARDY, R. W. & WERTZ, G. W. 1998. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol*, 72, 520-6.
- HARMON, S. B., MEGAW, A. G. & WERTZ, G. W. 2001. RNA sequences involved in transcriptional termination of respiratory syncytial virus. *J Virol*, 75, 36-44.
- HARRIS, J. & WERLING, D. 2003. Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response. *Cell Microbiol*, 5, 671-80.
- HEMINWAY, B. R., YU, Y., TANAKA, Y., PERRINE, K. G., GUSTAFSON, E., BERNSTEIN, J. M. & GALINSKI, M. S. 1994. Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology*, 200, 801-5.
- HENDRICKS, D. A., BARADARAN, K., MCINTOSH, K. & PATTERSON, J. L. 1987. Appearance of a soluble form of the G protein of respiratory syncytial virus in fluids of infected cells. *J Gen Virol*, 68 ( Pt 6), 1705-14.
- HENDRICKS, D. A., MCINTOSH, K. & PATTERSON, J. L. 1988. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol*, 62, 2228-33.
- JIN, H., ZHOU, H., CHENG, X., TANG, R., MUNOZ, M. & NGUYEN, N. 2000. Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology*, 273, 210-8.
- JOHNSON, P. R., SPRIGGS, M. K., OLMSTED, R. A. & COLLINS, P. L. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 5625-9.
- KIM, H. W., CANCHOLA, J. G., BRANDT, C. D., PYLES, G., CHANOCK, R. M., JENSEN, K. & PARROTT, R. H. 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*, 89, 422-34.
- KIMMAN, T. G., SOL, J., WESTENBRINK, F. & STRAVER, P. J. 1989a. A severe outbreak of respiratory tract disease associated with bovine respiratory syncytial virus probably enhanced by vaccination with modified live vaccine. *Vet Q*, 11, 250-3.

- KIMMAN, T. G., STRAVER, P. J. & ZIMMER, G. M. 1989b. Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: morphologic and serologic findings. *Am J Vet Res*, 50, 684-93.
- KLEM, T. B., GULLIKSEN, S. M., LIE, K. I., LOKEN, T., OSTERAS, O. & STOKSTAD, M. 2013. Bovine respiratory syncytial virus: infection dynamics within and between herds. *Vet Rec*, 173, 476.
- KLEM, T. B., RIMSTAD, E. & STOKSTAD, M. 2014. Occurrence and phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in outbreaks of respiratory disease in Norway. *BMC Vet Res*, 10, 15.
- KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M., GRIFFIN, D. E., LAMB, R. A., MARTIN, M. A., ROIZMAN, B., & STRAUS, S. E. 2013. Fields Virology. Vol I+ II.
- KRUSAT, T. & STRECKERT, H. J. 1997. Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch Virol*, 142, 1247-54.
- KRZYZANIAK, M. A., ZUMSTEIN, M. T., GEREZ, J. A., PICOTTI, P. & HELENIUS, A. 2013. Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS Pathog*, 9, e1003309.
- KUO, L., GROSFELD, H., CRISTINA, J., HILL, M. G. & COLLINS, P. L. 1996. Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J Virol*, 70, 6892-901.
- KURT-JONES, E. A., POPOVA, L., KWINN, L., HAYNES, L. M., JONES, L. P., TRIPP, R. A., WALSH, E. E., FREEMAN, M. W., GOLENBOCK, D. T., ANDERSON, L. J. & FINBERG, R. W. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*, 1, 398-401.
- KWILAS, S., LIESMAN, R. M., ZHANG, L., WALSH, E., PICKLES, R. J. & PEEPLES, M. E. 2009. Respiratory syncytial virus grown in Vero cells contains a truncated attachment protein that alters its infectivity and dependence on glycosaminoglycans. *J Virol*, 83, 10710-8.
- LANGEDIJK, J. P., MELOEN, R. H., TAYLOR, G., FURZE, J. M. & VAN OIRSCHOT, J. T. 1997. Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. *J Virol*, 71, 4055-61.

- LANGEDIJK, J. P., SCHAAPER, W. M., MELOEN, R. H. & VAN OIRSCHOT, J. T. 1996. Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, 77 ( Pt 6), 1249-57.
- LARSEN, L. E. 2000. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. *Acta Vet Scand*, 41, 1-24.
- LARSEN, L. E., TJORNEHOJ, K. & VIUFF, B. 2000. Extensive sequence divergence among bovine respiratory syncytial viruses isolated during recurrent outbreaks in closed herds. *J Clin Microbiol*, 38, 4222-7.
- LARSEN, L. E., TJORNEHOJ, K., VIUFF, B., JENSEN, N. E. & UTTENTHAL, A. 1999. Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle: reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle. *J Vet Diagn Invest*, 11, 416-22.
- LERCH, R. A., ANDERSON, K., AMANN, V. L. & WERTZ, G. W. 1991. Nucleotide sequence analysis of the bovine respiratory syncytial virus fusion protein mRNA and expression from a recombinant vaccinia virus. *Virology*, 181, 118-31.
- LEVINE, S., KLAIBER-FRANCO, R. & PARADISO, P. R. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, 68 ( Pt 9), 2521-4.
- LIUZZI, M., MASON, S. W., CARTIER, M., LAWETZ, C., MCCOLLUM, R. S., DANSEREAU, N., BOLGER, G., LAPEYRE, N., GAUDETTE, Y., LAGACE, L., MASSARIOL, M. J., DO, F., WHITEHEAD, P., LAMARRE, L., SCOUTEN, E., BORDELEAU, J., LANDRY, S., RANCOURT, J., FAZAL, G. & SIMONEAU, B. 2005. Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, 79, 13105-15.
- MACLACHLAN, N. J., DUBOVI, E. J. & FENNER, F. 2011. *Fenner's veterinary virology*, London ; Boston, Elsevier/Academic Press.
- MALHOTRA, R., WARD, M., BRIGHT, H., PRIEST, R., FOSTER, M. R., HURLE, M., BLAIR, E. & BIRD, M. 2003. Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes Infect*, 5, 123-33.
- MALLIPEDDI, S. K. & SAMAL, S. K. 1992. Sequence comparison between the phosphoprotein mRNAs of human and bovine respiratory syncytial viruses

- identifies a divergent domain in the predicted protein. *J Gen Virol*, 73 ( Pt 9), 2441-4.
- MALLIPEDDI, S. K. & SAMAL, S. K. 1993. Sequence variability of the glycoprotein gene of bovine respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, 74 ( Pt 9), 2001-4.
- MALLIPEDDI, S. K., SAMAL, S. K. & MOHANTY, S. B. 1990. Analysis of polypeptides synthesized in bovine respiratory syncytial virus-infected cells. *Arch Virol*, 115, 23-36.
- MARTINEZ, I. & MELERO, J. A. 2000. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol*, 81, 2715-22.
- MELERO, J. A., GARCIA-BARRENO, B., MARTINEZ, I., PRINGLE, C. R. & CANE, P. A. 1997. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol*, 78 ( Pt 10), 2411-8.
- MEYER, G., DEPLANCHE, M. & SCHELCHER, F. 2008. Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 31, 191-225.
- MONEY, V. A., MCPHEE, H. K., MOSELY, J. A., SANDERSON, J. M. & YEO, R. P. 2009. Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 4441-6.
- MOUDY, R. M., SULLENDER, W. M. & WERTZ, G. W. 2004. Variations in intergenic region sequences of Human respiratory syncytial virus clinical isolates: analysis of effects on transcriptional regulation. *Virology*, 327, 121-33.
- NAVARRO, J., LOPEZ-OTIN, C. & VILLANUEVA, N. 1991. Location of phosphorylated residues in human respiratory syncytial virus phosphoprotein. *J Gen Virol*, 72 ( Pt 6), 1455-9.
- OBANDO, R. C., HIDALGO, M., MERZA, M., MONTOYA, A., KLINGEBORN, B. & MORENO-LOPEZ, J. 1999. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). *Prev Vet Med*, 41, 271-8.
- PASTEY, M. K., CROWE, J. E., JR. & GRAHAM, B. S. 1999. RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J Virol*, 73, 7262-70.
- PASTEY, M. K. & SAMAL, S. K. 1993. Structure and sequence comparison of bovine respiratory syncytial virus fusion protein. *Virus Res*, 29, 195-202.

- PASTEY, M. K. & SAMAL, S. K. 1995. Nucleotide sequence analysis of the non-structural NS1 (1C) and NS2 (1B) protein genes of bovine respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, 76 ( Pt 1), 193-7.
- PORNILLOS, O., GARRUS, J. E. & SUNDQUIST, W. I. 2002. Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol*, 12, 569-79.
- ROBERTS, S. R., LICHTENSTEIN, D., BALL, L. A. & WERTZ, G. W. 1994. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol*, 68, 4538-46.
- ROSSI, C. R. & KIESEL, G. K. 1974. Serological evidence for the association of bovine respiratory syncytial virus with respiratory tract disease in Alabama cattle. *Infect Immun*, 10, 293-8.
- SAA, L. R., PEREA, A., JARA, D. V., ARENAS, A. J., GARCIA-BOCANEGRA, I., BORGE, C. & CARBONERO, A. 2012. Prevalence of and risk factors for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador. *Trop Anim Health Prod*, 44, 1423-7.
- SACCO, R. E., MCGILL, J. L., PALMER, M. V., LIPPOLIS, J. D., REINHARDT, T. A. & NONNECKE, B. J. 2012. Neonatal calf infection with respiratory syncytial virus: drawing parallels to the disease in human infants. *Viruses*, 4, 3731-53.
- SACCO, R. E., MCGILL, J. L., PILLATZKI, A. E., PALMER, M. V. & ACKERMANN, M. R. 2014. Respiratory syncytial virus infection in cattle. *Vet Pathol*, 51, 427-36.
- SAMAL, S. K., ZAMORA, M., MCPHILLIPS, T. H. & MOHANTY, S. B. 1991. Molecular cloning and sequence analysis of bovine respiratory syncytial virus mRNA encoding the major nucleocapsid protein. *Virology*, 180, 453-6.
- SANCHEZ-SECO, M. P., NAVARRO, J., MARTINEZ, R. & VILLANUEVA, N. 1995. C-terminal phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein occurs mainly at serine residue 232. *J Gen Virol*, 76 ( Pt 2), 425-30.
- SARMIENTO-SILVA, R. E., NAKAMURA-LOPEZ, Y. & VAUGHAN, G. 2012. Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine respiratory syncytial virus. *Viruses*, 4, 3452-67.
- SAUSKER, E. A. & DYER, N. W. 2002. Seroprevalence of OHV-2, BVDV, BHV-1, and BRSV in ranch-raised bison (*Bison bison*). *J Vet Diagn Invest*, 14, 68-70.

- SCHLENDER, J., BOSSERT, B., BUCHHOLZ, U. & CONZELMANN, K. K. 2000. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol*, 74, 8234-42.
- SCHLENDER, J., ZIMMER, G., HERRLER, G. & CONZELMANN, K. K. 2003. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol*, 77, 4609-16.
- SCHREIBER, P., MATHEISE, J. P., DESSY, F., HEIMANN, M., LETESSON, J. J., COPPE, P. & COLLARD, A. 2000. High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 47, 535-50.
- SMART, E. J., GRAF, G. A., MCNIVEN, M. A., SESSA, W. C., ENGELMAN, J. A., SCHERER, P. E., OKAMOTO, T. & LISANTI, M. P. 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*, 19, 7289-304.
- SOCHA, W. O. J. C. I. E. C. H., LARSKA, M. A. G. D. A. L. E. N. A., & ROLA, J. E. R. Z. Y. 2009. Molecular characterisation of the first polish isolates of bovine respiratory syncytial virus. *Bull Vet Inst Pulawy*, 53, 569-574.
- SOLIS-CALDERON, J. J., SEGURA-CORREA, J. C., AGUILAR-ROMERO, F. & SEGURA-CORREA, V. M. 2007. Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus-3 in beef cattle of Yucatan, Mexico. *Prev Vet Med*, 82, 102-10.
- SPANN, K. M., TRAN, K. C. & COLLINS, P. L. 2005. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol*, 79, 5353-62.
- SPIPKI, F. R., ALMEIDA, R. S., DOMINGUES, H. G., D'ARCE, R. C., FERREIRA, H. L., CAMPALANS, J., COSTA, S. C. & ARNS, C. W. 2006. Phylogenetic relationships of Brazilian bovine respiratory syncytial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein. *Virus Res*, 116, 30-7.
- STEC, D. S., HILL, M. G., 3RD & COLLINS, P. L. 1991. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology*, 183, 273-87.
- STOTT, E. J., THOMAS, L. H., COLLINS, A. P., CROUCH, S., JEBBETT, J., SMITH, G. S., LUTHER, P. D. & CASWELL, R. 1980. A survey of virus infections of the

- respiratory tract of cattle and their association with disease. *J Hyg (Lond)*, 85, 257-70.
- TAKIMOTO, T. & PORTNER, A. 2004. Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Res*, 106, 133-45.
- TAWAR, R. G., DUQUERROY, S., VONRHEIN, C., VARELA, P. F., DAMIER-PIOLLE, L., CASTAGNE, N., MACLELLAN, K., BEDOUELLE, H., BRICOGNE, G., BHELLA, D., ELEOUET, J. F. & REY, F. A. 2009. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science*, 326, 1279-83.
- TAYLOR, G., STOTT, E. J., FURZE, J., FORD, J. & SOPP, P. 1992. Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies. *J Gen Virol*, 73 ( Pt 9), 2217-23.
- TAYLOR, G., THOMAS, L. H., FURZE, J. M., COOK, R. S., WYLD, S. G., LERCH, R., HARDY, R. & WERTZ, G. W. 1997. Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions. *J Gen Virol*, 78 ( Pt 12), 3195-206.
- TAYYARI, F., MARCHANT, D., MORAES, T. J., DUAN, W., MASTRANGELO, P. & HEGELE, R. G. 2011. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat Med*, 17, 1132-5.
- TENG, M. N. & COLLINS, P. L. 2002. The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo. *J Virol*, 76, 6164-71.
- TRAN, T. L., CASTAGNE, N., DUBOSCLARD, V., NOINVILLE, S., KOCH, E., MOUDJOU, M., HENRY, C., BERNARD, J., YEO, R. P. & ELEOUET, J. F. 2009. The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *J Virol*, 83, 6363-74.
- TRIPP, R. A., DAKHAMA, A., JONES, L. P., BARSKEY, A., GELFAND, E. W. & ANDERSON, L. J. 2003. The G glycoprotein of respiratory syncytial virus depresses respiratory rates through the CX3C motif and substance P. *J Virol*, 77, 6580-4.
- TRIPP, R. A., JONES, L. P., HAYNES, L. M., ZHENG, H., MURPHY, P. M. & ANDERSON, L. J. 2001. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol*, 2, 732-8.

- TRUDEL, M., NADON, F., SIMARD, C., BELANGER, F., ALAIN, R., SEGUIN, C. & LUSSIER, G. 1989. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. *Arch Virol*, 107, 141-9.
- ULLOA, L., SERRA, R., ASENJO, A. & VILLANUEVA, N. 1998. Interactions between cellular actin and human respiratory syncytial virus (HRSV). *Virus Res*, 53, 13-25.
- UTTENTHAL, A., JENSEN, N. P. & BLOM, J. Y. 1996. Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds: diagnostic tools and epidemiology. *Vet Rec*, 139, 114-7.
- VALARCHER, J. F., BOURHY, H., LAVENU, A., BOURGES-ABELLA, N., ROTH, M., ANDREOLETTI, O., AVE, P. & SCHELCHER, F. 2001. Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. *Virology*, 291, 55-67.
- VALARCHER, J. F., FURZE, J., WYLD, S. G., COOK, R., ZIMMER, G., HERRLER, G. & TAYLOR, G. 2006. Bovine respiratory syncytial virus lacking the virokinin or with a mutation in furin cleavage site RA(R/K)R109 induces less pulmonary inflammation without impeding the induction of protective immunity in calves. *J Gen Virol*, 87, 1659-67.
- VALARCHER, J. F., SCHELCHER, F. & BOURHY, H. 2000. Evolution of bovine respiratory syncytial virus. *J Virol*, 74, 10714-28.
- VALARCHER, J. F. & TAYLOR, G. 2007. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet Res*, 38, 153-80.
- VAN DER POEL, W. H., BRAND, A., KRAMPS, J. A. & VAN OIRSCHOT, J. T. 1994. Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. *J Infect*, 29, 215-28.
- VICTORIO, C., ROSADIO, A., RIVERA, G., & MANCHEGO, S 2004. Seroprevalencia de virus neumopatógenos en alpacas adultas de la provincia de Canchis, Cusco. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 15, 127-131.
- WERTZ, G. W., COLLINS, P. L., HUANG, Y., GRUBER, C., LEVINE, S. & BALL, L. A. 1985. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 4075-9.
- WERTZ, G. W., KRIEGER, M. & BALL, L. A. 1989. Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation. *J Virol*, 63, 4767-76.

- YUNUS, A. S., COLLINS, P. L. & SAMAL, S. K. 1998. Sequence analysis of a functional polymerase (L) gene of bovine respiratory syncytial virus: determination of minimal trans-acting requirements for RNA replication. *J Gen Virol*, 79 ( Pt 9), 2231-8.
- ZHANG, L., PEEPLES, M. E., BOUCHER, R. C., COLLINS, P. L. & PICKLES, R. J. 2002. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol*, 76, 5654-66.
- ZIMMER, G., BUDZ, L. & HERRLER, G. 2001. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem*, 276, 31642-50.
- ZIMMER, G., CONZELMANN, K. K. & HERRLER, G. 2002. Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR(109) and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture. *J Virol*, 76, 9218-24.
- ZIMMER, G., ROHN, M., MCGREGOR, G. P., SCHEMANN, M., CONZELMANN, K. K. & HERRLER, G. 2003. Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J Biol Chem*, 278, 46854-61.