



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GENOMA COMPLETO
DEL VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 BOVINA”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

P R E S E N T A:

THALIA ADRIANA ALATORRE GARCIA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. GILBERTO VAUHGAN FIGUEROA

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC.

COMITÉ TUTOR

Dra. SUSANA MENDOZA ELVIRA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, UNAM

Dr. SALVADOR FONSECA CORONADO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, UNAM

ACADÉMICO INVITADO

Dr. FERNANDO GONZÁLEZ CANDELAS

UNIVERSIDAD DE VALENCIA



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.

“Y una vez que la tormenta termine, no recordarás como lo lograste, como sobreviviste. Ni siquiera estarás seguro si la tormenta ha terminado realmente.

Pero una cosa si es segura. Cuando salgas de esa tormenta, no serás la misma persona que entró en ella. De eso se trata esta tormenta.”

Haruki Murakami

“Pelearán contra ti, pero no te vencerán;
porque yo estoy contigo”

Jeremías 15:20

DEDICATORIAS

A Dios, por tantas oportunidades.

A mis padres, por todo el esfuerzo y los sacrificios que han realizado para que cumpla mis metas, por ser un ejemplo de fortaleza y dedicación. Por motivarme a dar siempre lo mejor de mí. Valoro y admiro todo lo que han hecho por mí. ¡Gracias por tanto!

A Erik, por el apoyo incondicional que me has brindado a lo largo de este proyecto, pero también, por ser mi mejor amigo, el mejor consejero y mi gran compañero de aventuras. ¡Te amo!

A mis abuelos, a mi hermano y a mis sobrinos por ser parte de mi motivación diaria. ¡Los quiero infinitamente!

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme terminar satisfactoriamente este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me fue otorgada para sustentar mis estudios de posgrado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por mi formación académica.

Al Dr. Gilberto Vaughan Figueroa, porque a pesar de la distancia, siempre estuvo pendiente de mi proyecto, por brindarme tantas oportunidades, por los consejos, la paciencia y por la confianza, ¡Gracias Gil!

Al Dr. Fernando González Candelas, porque sin el no hubiera sido posible el desarrollo y la culminación de este proyecto. Gracias por sus conocimientos, sus aportaciones y por toda la ayuda y apoyo que me brindó durante mi estancia.

Al Dr. Salvador Fonseca Coronado, por el apoyo que me brindó, por su disposición y por las aportaciones que enriquecieron mi trabajo de investigación.

A la Dra. Susana Mendoza Elvira, por todo el apoyo, por su disposición, por sus comentarios motivadores y por las aportaciones hacia mi trabajo.

A la Dra. Mayra, porque siempre estuvo dispuesta a ayudarme.

Al Dr. Rogelio Alonso Morales y al Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyan; por aceptar ser parte del jurado evaluador de la tesis y por todas las correcciones, comentarios y sugerencias que contribuyeron a mejorar el presente trabajo.

Al Dr. José Juan Martínez Maya, por estar siempre dispuesto a ayudarme y por todo el apoyo y la confianza.

A Alicia y Nidia, por toda la ayuda y apoyo que me brindaron a lo largo de este proyecto, pero también por su amistad.

A Ali y Charlie, por que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, por su confianza y por su amistad.

A mis ñoñitos: Zazil, Carlitos y mi querida Griz, gracias por hacer de las clases una maravillosa experiencia. Griz, gracias por el apoyo y por tu amistad, la maestría no hubiera sido lo mismo sin ti.

A todos los profesores que de alguna u otra manera contribuyeron con mi formación y a la realización de este trabajo. Gracias por sus enseñanzas.

A mi familia, a mis amigos, a mi novio por ser el motor de mi vida y a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	IV
ABSTRACT	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO	3
1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO	6
1.2. VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 BOVINA	8
1.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	8
1.2.2. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 BOVINA	9
1.3. EPIDEMIOLOGÍA	12
1.4. PATOGENESIS	16
1.4.1. SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES	18
1.5. DIAGNÓSTICO	19
1.6. REPLICACIÓN	20
1.7. RESPUESTA INMUNE CONTRA LA INFECCIÓN Y MÉCANISMOS DE EVASIÓN	25
1.8. VACUNAS	28
1.9. HETEROGENEIDAD GENÉTICA Y EVOLUCIÓN MOLECULAR	31
1.9.1. GENOTIPOS VIRALES	31
1.9.2. EVOLUCIÓN VIRAL	36
2. JUSTIFICACIÓN	41
3. HIPÓTESIS	42
4. OBJETIVO GENERAL	43
4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	44
5.1. RECOPIACIÓN Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS REPORTADAS.	44
5.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	45
5.3. ANÁLISIS DE RECOMBINACIÓN	47
5.3.1. PRUEBA DE TOPOLOGÍA	47
5.3.2. IDENTIFICACIÓN DE PROCESOS DE RECOMBINACIÓN	48
6. RESULTADOS	49
6.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	49

6.2. ANÁLISIS DE RECOMBINACIÓN	55
6.2.1. PRUEBA DE TOPOLOGÍA	55
6.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PROCESOS DE RECOMBINACIÓN	60
7. DISCUSIÓN	62
8. CONCLUSIONES	69
9. PROSPECTIVA	70
REFERENCIAS	71
ANEXOS	79
ANEXO 1 (SECUENCIAS ANALIZADAS)	79

TABLA DE CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 1. Principales características de los principales patógenos del complejo respiratorio bovino.	5
Cuadro 2. Vacunas comerciales disponibles en México que contienen al BPIV-3.	30
Cuadro 3. Porcentajes de identidad de nucleótidos entre los genotipos del virus.	33
Cuadro 4. Secuencias de genoma completo de BPIV-3 utilizadas en este trabajo.	45
Cuadro 5. Modelos de sustitución empleados para el análisis filogenético.	46
Cuadro 6. Resultados de la prueba de LM.	54
Cuadro 7. Resultados de la prueba de topología.	56
Cuadro 8. Resultados de las pruebas de detección de recombinación en RDP4.	60

TABLA DE CONTENIDO DE IMÁGENES

Figura 1. Clasificación taxonómica del virus de Parainfluenza-3 Bovina.	9
Figura 2. Estructura y Genoma general de los <i>Respirovirus</i> , género al cual pertenece el BPIV-3.	11
Figura 3. Mapa con las prevalencias del BPIV-3 reportadas alrededor del mundo.	13
Figura 4. A) Representación de los porcentajes de los virus del CRB que infectan simultáneamente a un hospedero. B) Representación de burbuja de las frecuencias de porcentajes relativos observados de las asociaciones existentes entre los virus pertenecientes al CRB	14
Figura 5. Ciclo de replicación del BPIV-3.	24
Figura 6. Mecanismos del BPIV-3 para evadir la respuesta inmune.	27
Figura 7. Distribución geográfica de los genotipos y subgenotipos de BPIV-3 previos a este estudio.	33
Figura 8. Árbol filogenético del BPIV-3. Se muestra la relación de los tres genotipos bovinos, comparándolos con algunas cepas de Parainfluenza-3 Humana (HPIV3), utilizando cepas de referencia	34
Figura 9. Árbol de análisis filogenético donde se muestran los tres genotipos del BPIV-3 utilizando secuencias reportadas en el GenBank. A) Utilizando la secuencia de nucleótidos del gen HN, B) Utilizando la secuencia de nucleótidos del gen M (En ambos casos podemos apreciar los 3 genotipos).	35
Figura 10. Diagrama de flujo general de la metodología utilizada a lo largo del proyecto.	48

Figura 11. Análisis filogenético del BPIV-3 basado en las SGC reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. Se indica el número de acceso, nombre de la cepa, país de origen, especie (excepto ganado bovino) y año de colección de la muestra. **50**

Figura 12. Análisis filogenético del gen F del BPIV-3 basado en las secuencias de este gen reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. (BPIV3-A: A1(Púrpura), A2 (Rojo), A3 (Fucsia); BPVI3-B: B1 (Aguamarina), A2 (Azul); BPIV3-C (Verde)). n=51 **51**

Figura 13. Análisis filogenético del gen HN del BPIV-3 basado en las secuencias de este gen reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. (BPIV3-A: A1(Púrpura), A2 (Rojo), A3 (Fucsia); BPVI3-B: B1 (Aguamarina), A2 (Azul); BPIV3-C (Verde)) Además muestra el subgenotipo hipotético A4 (Amarillo). n=75 **51**

Figura 14. Análisis filogenético del gen N del BPIV-3 basado en las secuencias de este gen reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. (BPIV3-A: A1(Púrpura), A2 (Rojo), A3 (Fucsia); BPVI3-B: B1 (Aguamarina), A2 (Azul); BPIV3-C (Verde)) Además muestra el subgenotipo hipotético A4 (Amarillo). n=82 **52**

Figura 15. Análisis filogenético del gen P del BPIV-3 basado en las secuencias de este gen reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. (BPIV3-A: A1(Púrpura), A2 (Rojo), A3 (Fucsia); BPVI3-B: B1 (Aguamarina), A2 (Azul); BPIV3-C (Verde)) Además muestra el subgenotipo hipotético A4 (Amarillo). n=37 **52**

Figura 16. Análisis filogenético del gen M del BPIV-3 basado en las secuencias de este gen reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. (BPIV3-A: A1(Púrpura), A2 (Rojo), A3 (Fucsia); BPVI3-B: B1 (Aguamarina), A2 (Azul); BPIV3-C (Verde)) Además muestra el subgenotipo hipotético A4 (Amarillo). En Verde azulado, se muestran las secuencias argentinas, que se encuentran filogenéticamente muy alejadas del resto de las secuencias de BPIV-3. n=52 **53**

Figura 17. Distribución geográfica de los genotipos y subgenotipos de BPIV-3 a partir de las secuencias reportadas en el GenBank. **55**

Figura 18. Comparación de los árboles generados en la prueba de topología. Se puede observar en el gen L el cambio de la cepa Texas/1981 del subgenotipo A2 (Rojo) al A1 (Púrpura). Los arboles fueron construidos por el método de Máxima Verosimilitud. Se utilizaron como *outgroup* la cepa del CPIV-3. **57**

Figura 19. Comparación de los árboles generados en la prueba de topología. Se puede observar en el gen L el cambio de la cepa Texas/1981 del subgenotipo A2 (Rojo) al A1 (Púrpura). Los arboles fueron construidos por el método de Máxima Verosimilitud. Se utilizaron como *outgroup* las cepas del HPIV-3. **58**

Figura 20. Árboles filogenéticos del gen L del BPIV-3 con diferentes *outgroups*, donde se muestra el cambio de la cepa Texas/1981 del subgenotipo A2 al A1, con respecto del resto de los genes. **59**

Figura 21. Secuencias recombinantes y sus donantes. En la cepa Texas/1981 la recombinación se dio de las bases 1 a 3,943 y de la 4,925 a 5,478, ambas por parte de la cepa TVMDL24; y en la cepa ISU/1992 la recombinación se dio de las bases 4,907 a 6,290 por parte de la cepa Texas/1981 y de la 4,907 a la 5,460 por parte de la cepa TVMDL24. **61**

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
A1	Virus de Parainfluenza-3 bovina, genotipo A, subgenotipo A1
A2	Virus de Parainfluenza-3 bovina, genotipo A, subgenotipo A2
A3	Virus de Parainfluenza-3 bovina, genotipo A, subgenotipo A3
A4	Virus de Parainfluenza-3 bovina, genotipo A, subgenotipo A4
aa	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
B1	Virus de Parainfluenza-3 bovina, genotipo B, subgenotipo B1
B2	Virus de Parainfluenza-3 bovina, genotipo B, subgenotipo B2
BAV-3	Adenovirus Bovino tipo 3
BAV-7	Adenovirus Bovino tipo 7
BCV	Coronavirus Bovino
BHV-1	Herpesvirus Bovino tipo 1
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPIV-3	Virus de Parainfluenza-3 Bovina
BPIV3-A	Virus de parainfluenza-3 bovina, genotipo A
BPIV3-B	Virus de parainfluenza-3 bovina, genotipo B
BPIV3-C	Virus de parainfluenza-3 bovina, genotipo C
BRSV	Virus Sincitial Respiratorio Bovino
BVDV	Virus de Diarrea Viral Bovino
BVDV-1	Virus de Diarrea viral bovina tipo 1
BVDV-1b	Virus de Diarrea viral bovina tipo 1, subgenotipo b
BVDV-1c	Virus de Diarrea viral bovina tipo 1, subgenotipo c
BVDV-2	Virus de Diarrea viral bovina tipo 2
CPIV-3	Virus de Parainfluenza-3 Caprina
CRB	Complejo Respiratorio Bovino
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> o Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EUA	Estados Unidos de América
F	Proteína Fusión
G	Distribución gamma
GTR	General Time Reversible
h	Horas
HN	Hemaglutinina/neuraminidasa
HPIV-1	Virus de Parainfluenza Humana-1
HPIV-3	Virus de Parainfluenza Humana-3
HPIV-5	Virus de Parainfluenza Humana-5
I	Proporción de sitios invariables
IFN	Interferón

IRF-3	Factor regulador de interferón-3
K3Pu	Método Kimura de 3 parámetros
kg	Kilogramos
L	Proteína polimerasa Larga
Le	Secuencia Líder (Leader)
LM	Mapeo de Verosimilitud
M	Proteína Matriz
MDA5	<i>Melanoma differentiation associated factor 5</i> o factor 5 asociado a la diferenciación de melanomas
ML	Máxima Verosimilitud
N	Nucleoproteína
NCBI	National Center for Biotechnology information
NK	Natural Killers
nm	Nanometros
OML	Liposomas de oligomanosa
ORF	Open Reading Frame o Marco abierto de lectura
P	Fosfoproteína
PAL	Péptido antimicrobiano Lingual
PAMP's	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> o Patrones moleculares asociados a patógenos
PAT	Péptido antimicrobiano Traqueal
PCLS	<i>Precision-cut lung slices</i> o cortes de pulmón de alta precisión
PI	Post Infección
RIB	Rinotraqueitis Infecciosa Bovina
RIG-1	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i> o Gen inducible por ácido retinóico 1
RLR's	<i>RIG like receptors</i> o Receptores tipo RIG
RNP	Ribonucleoproteína
RRP's	Receptores de reconocimiento de PAMP's
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-Transcriptasa Reversa
SGC	Secuencias de Genoma Completo
SNG	Secuenciación de Nueva Generación
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i> o Proteínas de la familia de los transductores de señal y activadores de la transcripción
TLR's	<i>Toll-like receptors</i> o Receptores tipo Toll
TN	Método Tamura-Nei
Tr	Secuencia remolque (Trailer)
TT	Prueba de Topología
USDA	United States Department of Agriculture
VAI	Vacunas de Antígenos Inactivados
ViPR	Virus Pathogen Database and Analysis Resource
VVM	Virus vivo modificado

ABSTRACT

The Bovine Parainfluenza-3 virus (BPIV-3) is one of the main viruses associated with the Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC). This worldwide virus is able to infect the bovine respiratory tract, causing since subclinical infections till severe pneumonia, generating significant economic losses in the cattle industry. Because of BPIV-3 is an RNA virus that has a high potential for genetic variation, which allows it to evolve and adapt quickly to different environmental conditions and hosts, the molecular characterization of the virus was carried out from GenBank reported sequences to determined the recombination role in the BPIV-3 evolution. In this study, twenty-two complete genome sequences of BPIV-3 were analyzed to determine genotypes and subgenotypes of the virus; 250 partial sequences of different virus genes were utilized to determinate the distribution of the genotypes and subgenotypes present worldwide; using a topology test, phylogenetic incongruities were found and finally the RDP4 program had been used to confirmed recombination events. Four potential recombination events were found in conjunction with phylogenetic incongruities in the L gene, between sequences of swine and cattle, which shows the ability of the virus to adapt to cells of different species, demonstrating that the transmission between species is vital for the evolution of this virus and that the recombination forms part of the evolutionary mechanisms of the virus.

RESUMEN

El virus de Parainfluenza-3 Bovina (BPIV-3), es uno de los principales virus asociados al Complejo Respiratorio Bovino (CRB). Este complejo es una enfermedad multifactorial que representa una de las principales causas de muerte en las explotaciones bovinas, ocasionando grandes pérdidas económicas. Este virus de distribución mundial, es capaz de infectar el tracto respiratorio bovino causando desde infecciones subclínicas, hasta neumonía severa, especialmente cuando participan patógenos bacterianos.

Debido a que el BPIV-3 es un virus ARN que posee un alto potencial de variación genética, lo que le permite evolucionar y adaptarse rápidamente a diferentes condiciones ambientales y hospederos, se llevó a cabo la caracterización molecular del virus a partir de secuencias reportadas en el GenBank. Se analizaron 22 secuencias de genoma completo del BPIV-3 para precisar los genotipos y subgenotipos, se estableció la distribución de los genotipos presentes a nivel mundial a partir de 250 secuencias reportadas; y se determinó, mediante una prueba de topología, búsqueda de incongruencias filogenéticas y el programa RDP4, que la recombinación forma parte de los mecanismos evolutivos del virus. Se encontraron cuatro eventos potenciales de recombinación, en conjunto con incongruencias filogenéticas en el gen L entre secuencias aisladas de ganado porcino y ganado bovino, lo que evidencia la capacidad de adaptación del virus a células de diferentes especies, demostrando que la transmisión entre especies es de vital importancia para la evolución de este virus. Esta información será de gran utilidad para entender mejor la epidemiología molecular del mismo y poder guiar el diseño de vacunas y el desarrollo de mejores técnicas de diagnóstico, así como de mejores tratamientos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO

El virus de Parainfluenza-3 Bovina (BPIV-3), es uno de los principales virus asociados al Complejo Respiratorio Bovino (CRB). Este complejo es una enfermedad multifactorial conocida comúnmente como “Fiebre de embarque” y representa una de las principales causas de muerte en las explotaciones bovinas, ocasionando grandes pérdidas económicas (Gershwin *et al.*, 2015).

En 2010, el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) reportó que los problemas respiratorios representan la principal causa de muerte del ganado, ocasionando el 26.5% del total de las muertes y dentro de estas se categorizó al CRB como el principal problema respiratorio del ganado. De igual manera, el CRB es una enfermedad económicamente importante ya que las pérdidas se estiman entre \$23.23 y hasta \$54.01 (dólares americanos) por animal tratado por esta enfermedad, incluyendo mortalidad, tratamientos y pérdidas productivas (Schneider *et al.*, 2009; Neibergs *et al.*, 2014; Grissett *et al.*, 2015). Aunque estos costos estimados aparentan ser bajos, son económicamente significativos cuando se multiplican por el número de cabezas de ganado de cada producción y también, debido a la baja en el margen de utilidades en las empresas

El CRB se asocia con diversos agentes bacterianos, principalmente: *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis* e *Histophilus somni*, asociados en gran parte a agentes virales. Entre los principales virus asociados al complejo, se encuentran principalmente: el Herpes virus Bovino tipo 1 (BHV-1), también conocido como el virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (RIB), el virus

de Diarrea Viral Bovina (BVDV), el Virus Sincitial Respiratorio Bovino (BRSV) y por supuesto el Virus de Parainfluenza-3 Bovina (BPIV-3) (Cusack *et al.*, 2003; Gershwin *et al.*, 2015). Sin embargo, existen otros virus y bacterias asociados al complejo hallados recientemente en un estudio metagenómico y descritos previamente por algunos autores, entre los que se encuentran el Coronavirus Bovino (BCV), los Adenovirus Bovinos tipo 3 y tipo 7 (BAV-3 y BAV-7), los virus de Rinitis Bovina A y B, el virus de la Influenza Bovina D, el Parvovirus bovino tipo 2 y el Astrovirus Bovino, además de diferentes especies del género *Mycoplasma* (Härtel *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2015). Cada patógeno del complejo posee características únicas con las que contribuye para provocar la enfermedad y resistir las defensas del hospedador produciendo neumonía y en casos muy severos la muerte del animal. Entre los principales signos clínicos del complejo se encuentran: fiebre, aumento de la frecuencia respiratoria, tos, descarga nasal, lagrimeo, pérdida del apetito y en algunos casos diarrea (Schneider *et al.*, 2009; Love *et al.*, 2014) **(Cuadro 1)**.

Existen otros factores que contribuyen al desarrollo del CRB, entre los cuales se encuentran factores ambientales como los cambios bruscos de temperatura y el estrés provocado durante el embarque y transporte de los animales, debido a los tiempos tan largos de transporte y a la deshidratación que sufren los animales durante el trayecto, lo que suprime la respuesta inmune y permite la transmisión viral. El estrés puede ser provocado también por factores de manejo como la castración y descorne, además de los factores propios del animal como el origen, raza, edad, y peso (Taylor *et al.*, 2010a, 2010b).

Cuadro 1. Principales características de los principales patógenos del complejo respiratorio bovino.
(Modificado de Gershwin *et al.*, 2015)

Patógeno	Características	Mecanismos de patogenicidad/Signos	Efecto en la respuesta inmune
BRSV	Virus ARN de cadena negativa.	Entra por mucosa respiratoria, infecta el epitelio bronquial, causa la formación de células sincitiales y bronquiolitis.	Favorece respuesta Th2 y deprime inducción de linfocitos T citotóxicos.
	Familia: <i>Paramyxoviridae</i>	Fiebre, depresión, aumento de la frecuencia respiratoria y tos.	
BHV-1	Virus ADN	Entra por mucosa respiratoria, causa apoptosis de células epiteliales.	Evade mecanismo de respuesta del hospedador afectando la función de las quimiocinas.
	Familia: <i>Herpesviridae, alphavirinae</i>	Fiebre, tos, úlceras en la boca, conjuntivitis, rinotraqueítis, aborto e infecciones del tracto reproductivo.	
BVDV	Virus ARN de cadena positiva	Propagación por secreciones, afecciones múltiples (aborto, infección persistente)	Causa inmunosupresión, localiza y mata tejido linfoide de las placas de peyer.
	Familia: <i>Flaviviridae.</i>		
<i>Pasteurella multocida</i>	Gram negativa, cocobacilo	Parte de la microbiota de las vías respiratorias altas; el estrés y las infecciones virales permiten que infecte el pulmón y cause bronconeumonía.	Múltiples factores de virulencia: cápsula antifagocítica, LPS, toxinas proteicas.
	Familia: <i>Pasteurellaceae</i>		
<i>Mannheimia hemolítica</i>	Gram negativa cocobacilo	Comensal de las vías respiratorias altas. Patógeno oportunista. Causa bronconeumonía.	Múltiples factores de virulencia: adhesinas, polisacáridos capsulares, LPS, leucotoxina, proteína de unión de transferrina.
	Familia: <i>Pasteurellaceae</i>		
<i>Mycoplasma bovis</i>	No posee pared	Sinergia con patógenos del CRB, forma biopelículas para facilitar su persistencia. Mastitis, artritis, otitis media, neumonía, fiebre, tos, anorexia y descarga nasal.	Adhesinas, antígenos de lipoproteínas de membrana de superficie. Favorece respuesta Th2. Inhibe el estallido respiratorio de los neutrófilos.
<i>Histophilus somni</i>	Gram negativa cocobacilo	Comensal del tracto reproductivo, también se encuentra en tracto respiratorio alto.	LPS, apoptosis de células endoteliales. Proteína de unión a inmunoglobulinas.
	Familia: <i>Pasteurellaceae</i>	Meningoencefalitis, enfermedad respiratoria, mastitis, otitis media, polisinovitis y enfermedades del tracto reproductivo.	

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO

P. multocida y *M. haemolytica* son parte de la microbiota del aparato respiratorio superior, que bajo condiciones de inmunosupresión se comportan como oportunistas y pueden causar patologías en el tracto respiratorio inferior. A pesar de que las enfermedades respiratorias en bovinos son una importante causa de pérdidas económicas en México, son pocos los estudios que indiquen su situación actual y su impacto económico, así como la frecuencia con que *M. haemolytica* y *P. multocida* se aíslan en animales con neumonías, particularmente en bovinos (De la Rosa-Romero *et al.*, 2012).

En Estados Unidos se reportaron prevalencias entre 65.3% y hasta 95% de *Pasterella* spp. (DeRosa *et al.*, 2000; Storz *et al.*, 2000), mientras que, en México, no se han reportado prevalencias a nivel nacional, pero se notificó en el 2012 una prevalencia del 16% al 54% en aislamientos de este género bacteriano a partir de muestras de pulmón de bovinos del estado de Hidalgo. No obstante, en cuanto a los aislamientos de *M. haemolytica* en el mismo estado, la incidencia reportada fue de casi el 29%, en exudado nasal (15.25%) y en lavado broncoalveolar (13.55%). En este estudio, los menores porcentajes de aislamiento de estas bacterias se encontraron en animales vacunados contra RIB (29.78%), BVDV (30.47%), BPIV-3 (29.6%), BRSV (30.33%) y mannheimiosis (30.90%), aunque no necesariamente se atribuye, de manera exclusiva, a la protección conferida por las vacunas empleadas (De la Rosa-Romero *et al.*, 2012).

No se sabe mucho sobre la distribución de *H. somni* y no existen estudios sobre la epidemiología de este patógeno en el país. En el caso de *M. bovis*, se sabe que es

de distribución mundial, aunque en muy pocos países se han hecho estudios sobre la prevalencia de este microorganismo en el ganado y actualmente no hay estudios de este tipo en México (Arede *et al.*, 2016).

En cuanto a la epidemiología de los virus pertenecientes al CRB, estos han sido reportados en diversos países. El BHV-1 se ha reportado en Australia, Canadá, Estados Unidos, Gran Bretaña, Nueva Zelanda, Sudáfrica y distintos países de Europa. En México se ha identificado la presencia de este virus en diferentes regiones de la república con una prevalencia del 16% al 70% a partir de muestras serológicas (Juárez-Barranco *et al.*, 2003; Segura-Correa *et al.*, 2016).

El BVDV se considera de distribución mundial y los dos genotipos de este virus se han caracterizado en distintas partes del mundo. Se ha determinado que el 88.2% de los virus aislados pertenecen al BVDB-1 y el resto al BVDV-2; además del primer grupo se sabe que el BVDV-1b es el subgenotipo dominante a nivel mundial y el más común en América, Asia y Europa (Yesilbag *et al.*, 2017). En México, más del 96% de los virus que se han analizado filogenéticamente pertenecen al genotipo BVDV-1 y dentro de este, el subgenotipo más común en nuestro país es el BVDV-1c. En estudios hechos en el norte del país, se ha determinado a partir de pruebas serológicas que el virus tiene una prevalencia del 47.8%, teniendo como principal factor de riesgo la introducción de animales infectados a las granjas (Segura-Correa *et al.*, 2016).

El BRSV es de distribución mundial, tiene alta morbilidad y en ciertas instancias es responsable del 60% de las enfermedades clínicas respiratorias en los hatos. La

enfermedad presenta una morbilidad por arriba del 80% y una mortalidad variada que puede llegar hasta 20% en brotes severos. En México, la circulación del virus ha sido recientemente reportada en granjas del estado de Colima y Yucatán; con prevalencias de 52% y 90.8% respectivamente (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012).

En México, el BRSV y el BPIV-3 se identificaron en 54.1% y 66.6% respectivamente en bovinos con signos correspondientes con CRB, siendo esta prevalencia mayor que la de los otros virus del complejo (Juárez-Barranco *et al.*, 2003).

1.2. VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 BOVINA

El BPIV-3 fue aislado por primera vez en Estados Unidos en 1959 y actualmente se sabe que la enfermedad es de distribución mundial. El virus es capaz de infectar el tracto respiratorio bovino por la dispersión en aerosoles de las secreciones nasales o por objetos contaminados. Cuando no se complica causa infecciones subclínicas, aunque puede causar neumonía severa, especialmente cuando participan patógenos bacterianos como *M. haemolytica*, *P. multocida*, los cuales también pueden interactuar con *Mycoplasma* spp. En casos de infección clínica podemos ver animales con fiebre, tos, descarga nasal serosa o mucopurulenta, rinitis, traqueítis, inapetencia, y aumento de la frecuencia respiratoria (Ellis, 2010).

1.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El BPIV-3 es un virus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*. Esta familia se divide en dos subfamilias: *Pneumovirinae*, que posee 2 géneros (*Metapneumovirus* y *Pneumovirus*); y *Paramyxovirinae*, la cual posee 7 géneros (*Aquaparamyxovirus*,

Avulavirus, *Ferlavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Rubulavirus* y *Respirovirus*). El BPIV-3 pertenece al género *Respirovirus* (Figura 1).

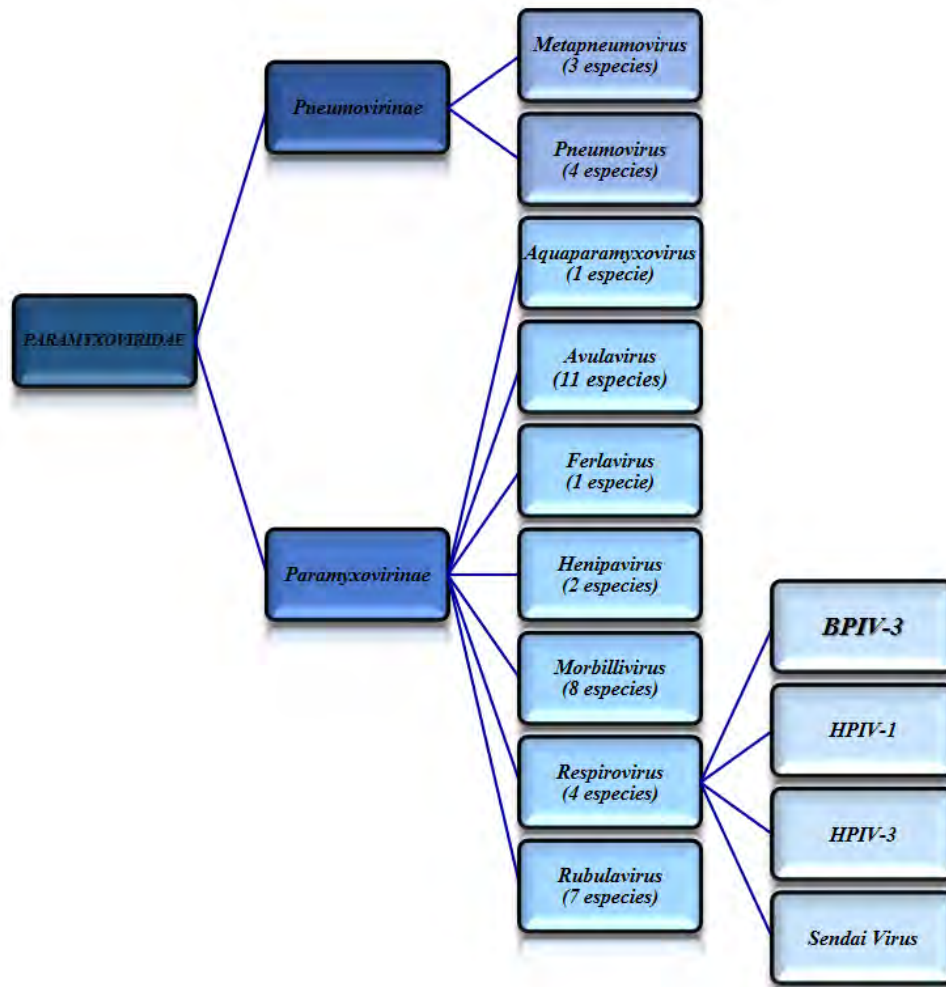


Figura 1. Clasificación taxonómica del virus de Parainfluenza-3 Bovina (ViPR).

1.2.2. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 BOVINA

Al igual que otros virus de Parainfluenza, el BPIV-3 es un virión esférico a pleomorfo de 150 a 200 nm que consiste en la nucleocápside, rodeada por una envoltura lipídica que deriva de la membrana plasmática de las células que infectan (Ellis, 2010).

Es un virus ARN de cadena simple de sentido negativo de aproximadamente 15,456 bases que codifica 6 marcos abiertos de lectura (ORF's), que comprenden 6 genes (N-P-M-F-HN-L) los cuales codifican para 9 proteínas: La proteína de la nucleocápside o nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína matriz (M), la proteína de fusión (F), la hemaglutinina/neuramidasa (HN) y la proteína polimerasa larga (L). Además de las proteínas accesorias no estructurales V, C y D, resultantes de la inserción de residuos de guanina en el gen P por la polimerasa viral, lo que resulta en marcos abiertos de lectura alternativos, lo que permite que un gen codifique múltiples proteínas. Se sabe que estas proteínas están relacionadas en la inhibición del IFN- α e IFN- β , en células infectadas por *Respirovirus* (Komatsu *et al.*, 2007). En cuanto a las regiones intergénicas, estas contienen secuencias conservadas para la adecuada iniciación y termino de la transcripción de todos los ORF's (Neill *et al.*, 2015) (**Figura 2**).

La proteína de la nucleocápside, en asociación con las proteínas P y L, junto con el genoma forman la Ribonucleoproteína (RNP) del virus, la cual tiene una forma helicoidal. Las proteínas P y L asociadas con la nucleoproteína o libres en el citoplasma siempre se encuentran formando un complejo que comprende la ARN polimerasa viral que es esencial para la transcripción del ARN mensajero (ARNm) y la replicación del ARN genómico.

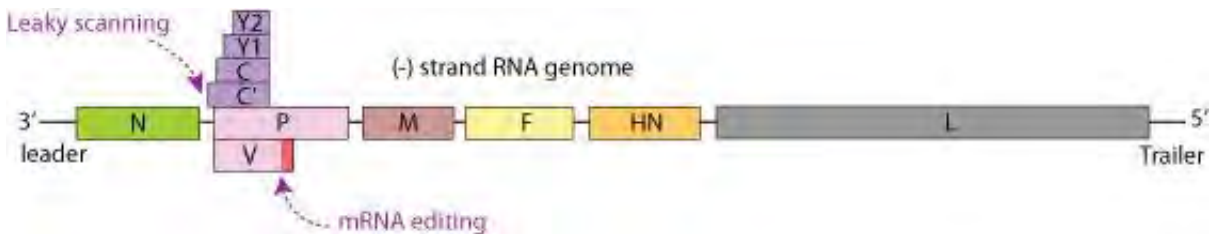
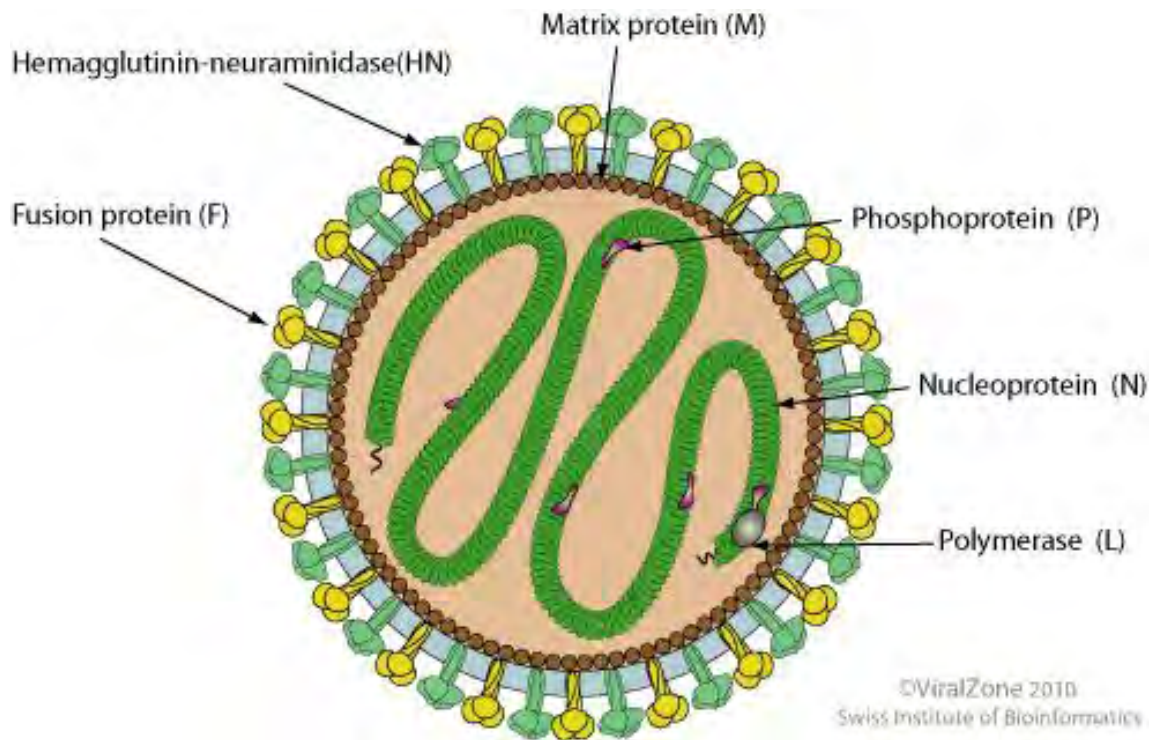


Figura 2. Estructura y Genoma general de los *Respirovirus*, género al cual pertenece el BPIV-3. (modificado de ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, 2010)

La proteína M es conservada y no está glicosilada, es la proteína viral más abundante en células infectadas; se encuentra en la cara interna de la envoltura viral y es esencial en los procesos de ensamblaje y liberación de la progenie viral. Las proteínas F y HN están glicosiladas, se encuentran en la envoltura viral y son mediadoras del ataque y penetración a las células huésped. Los dominios de estas proteínas transmembranales que están expuestos al medio extracelular inducen la respuesta protectora de anticuerpos (Ellis, 2010).

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

Se considera que la infección por el BPIV-3 es de distribución mundial, aunque la prevalencia y la incidencia del virus por genotipos y subgenotipos no se conoce. En algunos países asiáticos se han reportado entre 45% y hasta 100% de animales seropositivos (Yavru *et al.*, 2005; Yeşilbağ y Güngör, 2007; Sackhaee *et al.*, 2009; Roshtkhari *et al.*, 2012; Shirvani *et al.*, 2012; Tuncer y Yesilbag, 2015). Respecto al continente europeo, se estima que el BRSV y el BPIV-3 infectan entre el 70% y 85% del ganado británico; en Suecia, se estima una seroprevalencia de entre 44% a 66% (Hagglund *et al.*, 2006). En otros países europeos se estiman seroprevalencias mayores al 70% (Härtel *et al.*, 2004; Shirvani *et al.*, 2012). En América Latina se han reportado prevalencias en hatos que van desde 78% hasta 100% (Juárez-Barranco *et al.*, 2003; Solis-Calderon *et al.*, 2007; Carbonero *et al.*, 2011; Figueroa-Chavez *et al.*, 2012). En Estados Unidos y Canadá, estos datos no se han estimado, pero se sabe que el CRB representa una de las principales causas de muerte del ganado, ocasionando hasta 57% de la mortalidad en animales destetados en diferentes provincias de Canadá y hasta el 46.5% de la mortalidad en el mismo periodo en los Estados Unidos (Gagea *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2016). Por otra parte, en Australia se ha reportado entre el 88% y hasta el 91% de animales seropositivos al BPIV-3 **(Figura 3)**.

Los estudios serológicos que han realizado en México, indican que las infecciones por este virus están ampliamente distribuidas en el territorio nacional, con una prevalencia que va del 16% al 86%. Por medio de un ensayo inmunohistoquímico en muestras de pulmón realizado en engordas en Culiacán, se demostró una

prevalencia del 66.6% (Juárez-Barranco *et al.*, 2003). Por otro lado, en Yucatán se estimó una seroprevalencia del 85.6% (Solis-Calderon *et al.*, 2007). Mientras, que en Colima se determinó una prevalencia del 60.8% (Figuroa-Chavez *et al.*, 2012) (Figura 3).

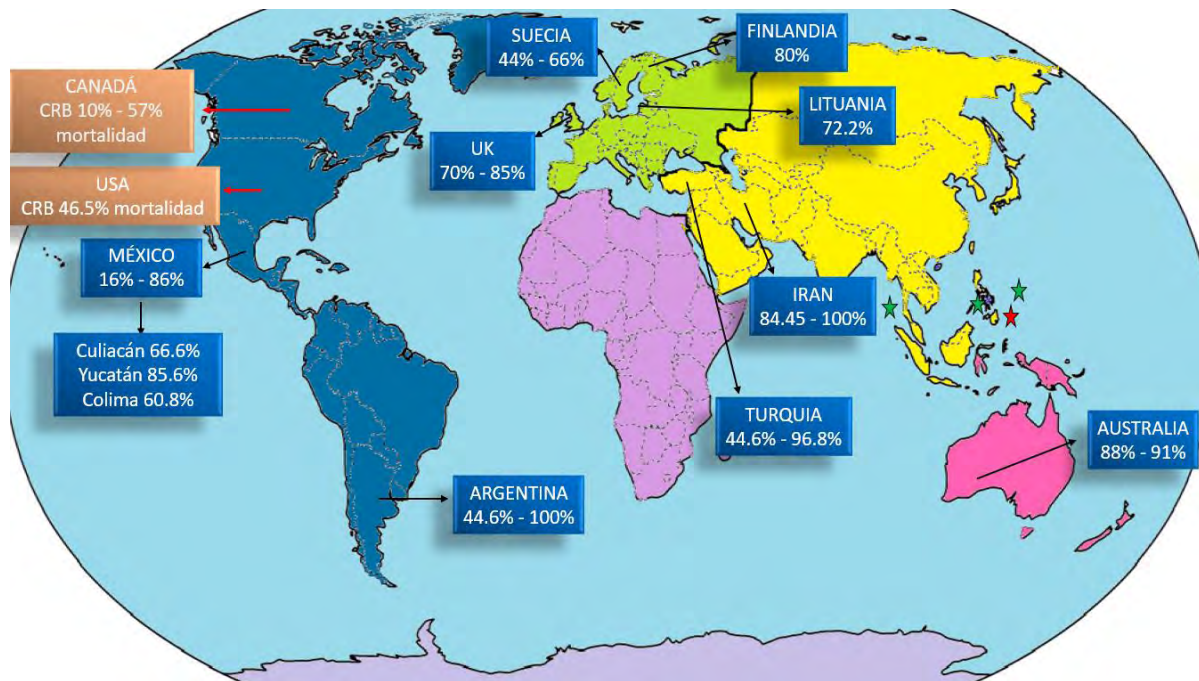


Figura 3. Mapa con las prevalencias del BPIV-3 reportadas alrededor del mundo.

El BPIV-3 se puede transmitir de manera directa, de animal a animal, por la inhalación de aerosoles que contengan al virus, lo que puede ocurrir dentro de los corrales, en mercados ganaderos y durante la transportación, principalmente (Ellis, 2010). El virus es excretado en las secreciones nasales, oculares y en menor medida por las heces. Usualmente, se encuentra en combinación con otro de los virus del complejo o con más de uno de estos. Diferentes estudios referentes al CRB han reportado que entre el 4.7% y 14.7% de los animales son infectados únicamente por un virus del complejo, entre 21.4% y 36.22% de los animales están infectados con dos virus, entre 5.3% y 42.8% están infectados con tres virus, entre 14.56% y

33.3% están infectados con cuatro virus, entre 3.93% y 19% están infectados con cinco virus y finalmente, 1.57% de los animales están infectados hasta con seis virus pertenecientes al complejo (Roshtkhari *et al.*, 2012; Shirvani *et al.*, 2012; O'Neill *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2015). Así mismo, se sabe que comúnmente el BPIV-3 se encuentra asociado con el BCV, el BRSV, el BHV-1 y finalmente por el virus de BVDV, en ese orden, respectivamente (Hagglund *et al.*, 2006; O'Neill *et al.*, 2014)

(Figura 4).

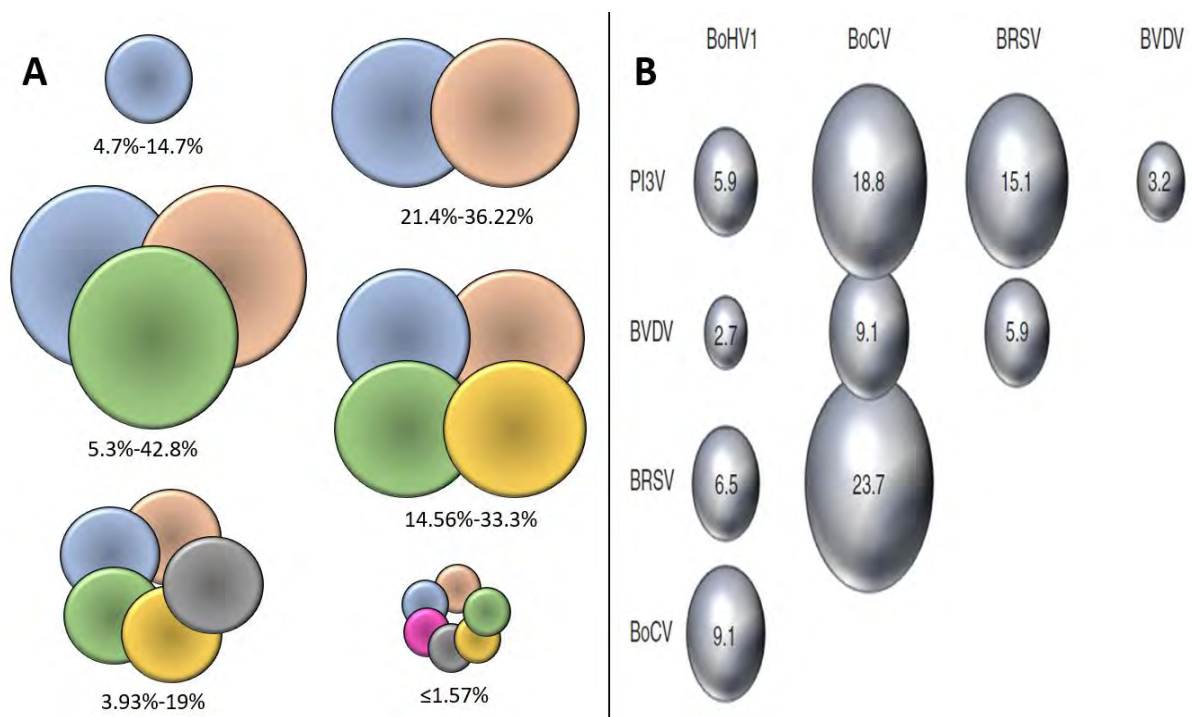


Figura 4. A) Representación de los porcentajes de los virus del CRB que infectan simultáneamente a un hospedero. **B)** Representación de burbuja de las frecuencias de porcentajes relativos observados de las asociaciones existentes entre los virus pertenecientes al CRB (Modificado de O'Neil *et al.*, 2014).

Los factores de riesgo que facilitan la infección por el BPIV-3 están descritos dentro del contexto del CRB debido a que los estudios se enfocan únicamente al complejo, así, dichos factores incluyen aquellos relacionados con el ambiente, el manejo, factores nutricionales, y por supuesto, genéticos. Dentro de los ambientales, se

considera el clima y los medios de transporte, como factores de suma importancia, ya que la mayor incidencia de la enfermedad se registra en otoño, después en invierno, verano y la menor incidencia en primavera (Tuncer y Yesilbag, 2015). Ha sido sugerido, en distintos estudios, que los cambios bruscos de temperatura más que la temperatura *per sé*, es lo que predispone a los animales a la enfermedad (Taylor *et al.*, 2010a). Como parte del clima, se ha reportado que la temperatura y la velocidad de los vientos incrementa la incidencia del complejo (Cernicchiaro *et al.*, 2012). En cuanto al transporte, es considerado el principal factor de riesgo no infeccioso del complejo, se han asociado largas distancias de transporte con el incremento en la incidencia de la enfermedad y que la distancia de transportación es directamente proporcional con el aumento en la incidencia del complejo debido a que disminuye la capacidad antioxidante, incrementa el estrés oxidativo y causa inmunosupresión (Chirase *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2010a). Otros estudios han utilizado las horas de transporte como referencia, y han estimado que en periodos de entre 6 y 24 horas de transporte, el ganado pierde en promedio entre 4.5% y 7.5% de su peso vivo, disminuyen los niveles de linfocitos y aumentan los niveles de neutrófilos, incrementan las concentraciones de proteína total, se genera deshidratación y cambios en el metabolismo energético; produciendo estrés e inmunosupresión (Earley *et al.*, 2010).

Respecto a los factores de manejo, el origen de los animales es muy importante, debido a que se ha visto que la incidencia aumenta al juntar animales de diferentes orígenes, principalmente si se adquirieron en mercados ganaderos. La edad y peso de los animales también es de suma importancia como factor de riesgo; los animales

jóvenes son más susceptibles a infecciones virales, siendo los animales menores de un año y con un peso menor a 250 kg, especialmente susceptibles (Sanderson *et al.*, 2008). El confinamiento y el tamaño del hato son de igual manera, factores de riesgo de suma importancia. Finalmente, procedimientos de rutina como la castración, descorne, y administración de medicamentos son considerados factores de estrés que producen inmunosupresión y por lo tanto se consideran factores que incrementan la incidencia del complejo (Taylor *et al.*, 2010a, 2010b).

Finalmente, se sabe que los factores genéticos pueden jugar un rol importante en la incidencia del complejo, ya que se ha reportado que algunas razas son más resistentes a la enfermedad que otras y que los bovinos heterocigotos y animales criollos son más resistentes que los animales de raza pura (Snowder *et al.*, 2005, 2006; Cusack *et al.*, 2007).

1.4. PATOGENESIS

La ruta normal de entrada del BPIV-3 al tracto respiratorio es vía intranasal o intratraqueal. El hospedador principal del BPIV-3, es el bovino, que constituye la principal fuente de infección y reservorio del virus; aunque los pequeños rumiantes (cabras, borregos y alpacas) también son hospederos y ya se ha reportado la infección por este virus en bóvidos silvestres como los búfalos. Una vez que el virus ha ingresado al tracto respiratorio, deberá encontrar una capa mucosa con alto contenido de ácido siálico, el receptor de la proteína HN, esta unión permite la fusión y entrada del virus a la célula, iniciando el ciclo de replicación. El ácido siálico está presente en una gran variedad de tipos celulares en el sistema respiratorio, entre

las cuales se encuentran las células traqueales, las células bronquiales ciliadas y no ciliadas, además de los neumocitos tipo I y II (Ellis, 2010; Kirchhoff *et al.*, 2014a).

In vitro, células de origen, humano, bovino y de primates son sensibles a la infección con este virus (Goris *et al.*, 2009; Kirchhoff *et al.*, 2014b). Al infectar células del epitelio ciliado de las vías respiratorias, *in vitro*, estas mostraban pequeños cambios citopatológicos incluyendo la formación de sincitios, una de las principales características del virus, pero cuando se infectaban cortes de pulmón de alta precisión (PCLS (precision-cut lung slices)), se podía observar un ligero grado de destrucción del epitelio en el lumen de los bronquiolos a las 48 h post-infección (PI) y el epitelio completamente destruido a los cinco días PI sin la formación de sincitios.

En un estudio realizado en ratones Balb/c para conocer la patogenia de una cepa del genotipo C del BPIV-3 reporta que se puede localizar al virus antes de las 24 h dentro de las células lo que sugiere que la replicación del virus es muy rápida, aunque no produce ningún signo en los ratones. Sin embargo, histológicamente se detectó la presencia de células linfoides y la infiltración de macrófagos, así como el adelgazamiento del septum alveolar y la presencia de exudado seroso. A los siete días PI se comienza a desarrollar una neumonía focal, las paredes de las venas alveolares se encuentran congestionadas y puede haber formación de trombos de manera ocasional. En cuanto a las lesiones esplénicas, estas ocurren en la pulpa blanca y baja la cantidad de células linfoides, de siete a 14 días PI. No se observaron lesiones en riñones, hígado o tráquea (Dong *et al.*, 2012; Ohkura *et al.*, 2015). No se ha descrito aun si existe alguna diferencia en la patogenia dependiendo del genotipo.

El virus es excretado en las secreciones nasales, oculares y en algunas ocasiones también por las heces. El virus comienza a excretarse en bovinos, a partir del día uno o dos PI, el pico de excreción del virus se da del día 3 al 5 PI y deja de excretarse entre los 10 y 13 días PI (Grissett *et al.*, 2015). Otros estudios mencionan que el virus se ha podido aislar de nariz hasta el día 9 y en pulmón hasta el día 12 PI, además de que los cambios histopatológicos se han visto hasta el día 14 PI; lo que nos sugiere que el virus permanece en el hospedero de 2 a 14 días (Ellis, 2010).

1.4.1. SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES

Es difícil determinar cuáles de los signos y lesiones que se presentan en el animal, corresponden al BPIV-3 ya que se encuentra en asociación con los demás microorganismos del CRB, pero en general los signos clínicos que presentan los animales con el virus van desde una infección asintomática hasta neumonía severa. Los principales signos que se describen en infecciones experimentales son: pirexia (40.9 a 41.4 °C) entre los días 2 y 5 PI, tos, inapetencia, descarga nasal serosa a mucopurulenta, respiración rápida y superficial, rinitis, traqueítis, estertores espiratorios secos y neumonía severa (Ellis, 2010).

Las lesiones que podemos observar se han descrito a partir de infecciones experimentales y se encuentran principalmente en pulmones, tales como: atelectasis, consolidación pulmonar en la región ventral anterior de los lóbulos pulmonares, especialmente en el lóbulo craneal, edema interlobular y puede presentarse pleuritis. Histopatológicamente, podemos encontrar bronquiolitis y alveolitis, restos celulares de células epiteliales ciliadas y no ciliadas muertas,

infiltración de células inflamatorias, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en epitelio bronquial y alveolar, formación de sincitios e hiperplasia del epitelio alveolar.

1.5. DIAGNÓSTICO

Existen 2 tipos de diagnóstico para el BPIV-3: el serológico y el molecular. Para cualquiera de los dos, la muestra de elección son las secreciones nasales, las cuales se obtienen con hisopos estériles transportados en medios estériles (Ellis, 2010). El BPIV-3 crece adecuadamente en cultivos de células de cornetes de bovino o de células de riñón de bovino y la identificación se da principalmente por el efecto citopático del virus, formación de cuerpos de inclusión y formación de sincitios; así como también con la utilización de técnicas de inmunofluorescencia o inmunocitoquímica (Ellis, 2010).

La detección de los virus respiratorios en medicina veterinaria se realiza con pruebas serológicas como inmunofluorescencia, ELISA o ensayos de sueroneutralización, así como por pruebas de inhibición de la hemaglutinación. Sin embargo, hay muchos factores que complican el uso de serología para el diagnóstico de este virus, entre los que se reporta la presencia de anticuerpos aun cuando la enfermedad no está en curso, por la presencia de anticuerpos maternos, por problemas con las pruebas comerciales, entre otros (Ellis, 2010; Roshtkhari *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015). Debido a esto se han desarrollado pruebas moleculares para el diagnóstico como la RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la proteína HN principalmente, así como métodos de Secuenciación de Nueva Generación (SNG) para la caracterización molecular del virus (Horwood *et al.*, 2008;

Zhu *et al.*, 2011; Neill *et al.*, 2015; Rai *et al.*, 2015). Debido a que el BPIV-3 se encuentra dentro del CRB se han desarrollado técnicas de RT-PCR multiplex en tiempo real para el diagnóstico de los virus que comprenden el complejo, obteniendo una prueba rápida, específica y sensible hasta en un 97% detectando 10^2 copias de cada virus (BRSV, BHV-1 Y BPIV-3) (Thonur *et al.*, 2012).

La aplicación de la tecnología de SNG en la virología está cambiando la forma en la que entendemos a los virus, sobre todo en las áreas de secuenciación del genoma completo, la evolución, la ecología, la transcriptómica y la meta-genómica; esta información es utilizada por la epidemiología molecular para investigar la evolución, la transmisión y la patogénesis de agentes virales, así como para la detección de mutaciones de resistencia a fármacos antivirales (Barzon *et al.*, 2011; Barba *et al.*, 2014).

Además la secuenciación masiva tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y translocaciones) como desequilibradas (deleciones y duplicaciones) (Rodríguez-Santiago y Armengol, 2012).

1.6. REPLICACIÓN

No hay estudios que describan el ciclo de replicación viral del BPIV-3, pero hay muchos puntos del ciclo de replicación del virus que se conocen por los experimentos en otros Paramyxovirus, principalmente miembros del género *Respirovirus*, debido a las similitudes entre el BPIV-3 y el HPIV-3.

La infección se inicia cuando el virus se une a receptores de la superficie celular, mediante la interacción de la proteína de unión HN y el ácido siálico de la superficie celular como su receptor. La proteína HN del BPIV-3 posee la característica de hemaglutinina de unirse al receptor de ácido siálico y actividad de Neuraminidasa de escisión del ácido siálico (Harrison *et al.*, 2010; Chang y Dutch, 2012). Esta proteína contiene un dominio citoplasmático, una región que abarca la membrana, una región de tallo y una cabeza globular. Las proteínas HN están orientadas de modo que su región amino-terminal se extiende hacia el citoplasma mientras que la región C-terminal es extracelular y está presente en la superficie celular y en el virión como un tetrámero compuesto por dímeros unidos por disulfuros y se ha demostrado que la cabeza globular contiene el sitio primario de unión al ácido siálico y el sitio de actividad de la neuraminidasa (Lawrence *et al.*, 2004; Moscona, 2005). Las estructuras cristalinas del dominio de la cabeza globular del HPIV-3 y el Virus de Parainfluenza Humana 5 (HPIV-5) muestran que este dominio está compuesto por cuatro monómeros de seis hojas β plegadas dispuestos en una simetría cuádruple y se sabe que todos los Paramyxovirus utilizan este dominio unido a receptor de la proteína HN para adaptarse a sus receptores en las células hospederas correspondientes, ya que este sitio de unión es capaz de adaptarse a diferentes análogos de ácido siálico (Yuan *et al.*, 2005; Bowden *et al.*, 2010; Chang y Dutch, 2012). Existe evidencia de un segundo sitio de unión en el HPIV-3 y en el HPIV-1, pero se desconoce el desplazamiento de este sitio de unión y también se asocia hipotéticamente al proceso de fusión (Alymova *et al.*, 2008; Mishin *et al.*, 2010). De hecho, otro estudio encontró tres sitios de unión secundarios que son diferentes del sitio de unión descrito por Mishin *et al.* 2010; se cree que estos sitios

adicionales de unión al receptor aumentan la avidéz general de la unión al virus para facilitar la entrada del virus y abren el panorama para una investigación más profunda sobre su función (Streltsov *et al.*, 2015). Es probable que el BPIV-3 también tenga uno o más sitios de enlace secundarios, pero es necesario confirmarlo. La proteína HN unida a su receptor es esencial para el proceso de fusión mediado por la proteína F.

La fusión permite que la RNP ingrese en el citoplasma de las células blanco. Las proteínas de fusión son sintetizadas como biológicos inactivos F0, que son escindidos por proteasas celulares, principalmente por la furina, en su forma activa F1 y F2, unidos por un puente disulfuro. Este cambio desencadena un cambio conformacional irreversible que permite la inmediata fusión (F1) con la membrana, requiriendo de pH neutro del medio extracelular para que F1 se pueda fusionar (Lawrence *et al.*, 2004; Moscona, 2005; Lamb *et al.*, 2006; Chang y Dutch, 2012; Xiao *et al.*, 2012).

La Replicación y la transcripción del virus se llevan a cabo en el citoplasma. La transcripción inicia con el ARN de cadena negativa que produce ARNm por la acción de la ARN polimerasa dependiente de ARN, por lo que no se replica usando ADN intermedio y comienza la traducción a proteínas. Por otro lado, la ARN polimerasa replica en un sistema de 2 pasos: produce ARN de cadena positiva complementario y a partir de este produce ARN de cadena negativa (Koonin y Dolja, 2014).

El material genético protegido por la Nucleocápside sirve como molde para la síntesis de ARN por el complejo de la ARN polimerasa. Tienen una secuencia Líder (*Leader* (Le)) y una secuencia remolque (*Trailer* (Tr)) localizadas en los extremos 3'

y 5' del genoma, que contienen elementos promotores. Las secuencias involucradas con el inicio de la transcripción, la poliadenilación y el término de la transcripción de cada gen están localizados al principio y término de este. Una característica de todos los mononegavirus es que llevan a cabo una transcripción por gradientes, lo que quiere decir que conforme la ARN polimerasa avanza a lo largo del molde sintetiza progresivamente menos ARNm, por lo que los genes cercanos a la región 3' se transcriben más rápido y son más abundantes que los genes cercanos a la región 5'. Las proteínas virales son sintetizadas en citoplasma y la cantidad de cada producto de gen corresponde al grado de transcritos de ARNm de ese gen. Las glicoproteínas virales son sintetizadas y glucosiladas en la vía secretora (Cox y Plemper, 2015).

Las proteínas de la nucleocápside se forman en el citoplasma, unen y cubren al ARN genómico formando complejos con las proteínas L y P en complejos RNP helicoidal y emigran hacia la superficie de la célula. La encapsidación del virus empieza con una proteína N unida a un sitio de nucleación o secuencia promotora. La proteína M es hidrofóbica, susceptible a la autoagregación y es esencial para la formación de partículas ya que sirve de enlace de la envoltura viral con la nucleocápside. La proteína posee 2 dominios cargados positivamente junto con la región de unión, lo que rige las interacciones electrostáticas entre la proteína y los fosfolípidos de la membrana celular para poder llevar a cabo el ensamblaje del virus, así las colas citoplasmáticas de las glicoproteínas interactúan con la proteína M para organizar dicho ensamblaje (Harrison *et al.*, 2010).

Las proteínas del virus migran hacia la membrana por complejos endosomales requeridos para el transporte. Una vez que se forma la RNP se introduce a la

partícula viral y solo debe contener una copia del genoma (tamaño, genoma completo y polaridad de ARN). El virus se libera por gemación desde la superficie celular (Harrison *et al.*, 2010) (**Figura 5**).

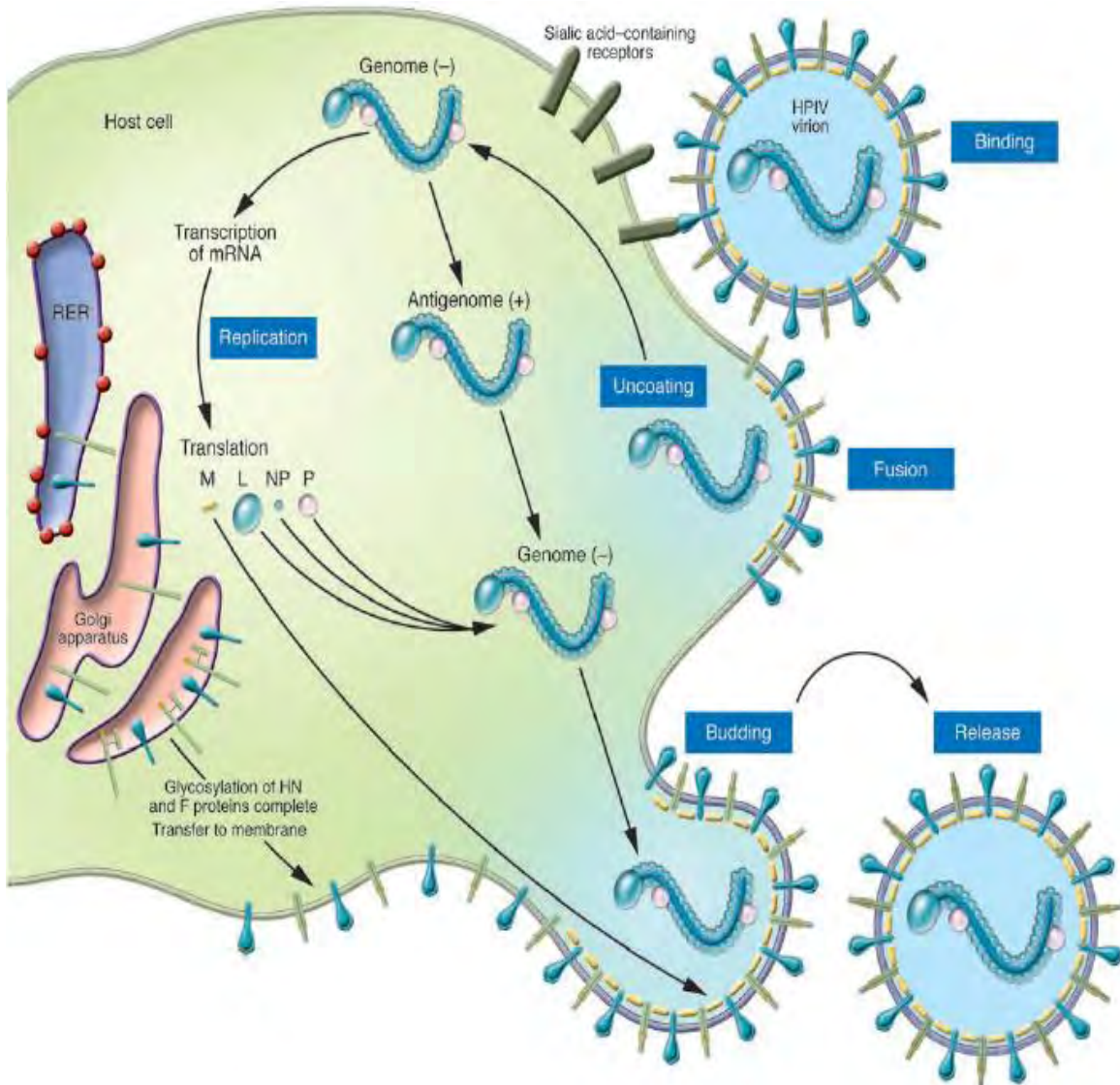


Figura 5. Ciclo de replicación del BPIV-3. (Traducido de Harrison *et al.*, 2010)

1.7. RESPUESTA INMUNE CONTRA LA INFECCIÓN Y MÉCANISMOS DE EVASIÓN

La respuesta inmune que se monta contra el BPIV-3 comienza con mecanismos de inmunidad innata, desde las barreras físicas, como la microbiota de las vías respiratorias altas, ya que ocupa micronutrientes y sitios de unión que resultan en la reducción de la colonización por parte de agentes patógenos. También ayudan barreras físicas como el epitelio estratificado escamoso de las narinas y pseudoestratificado ciliado del resto de las vías respiratorias y la producción de moco. Los mecanismos moleculares, incluyen péptidos antimicrobianos como las defensinas y catelicidinas; las α y β defensinas están presentes en los bovinos. Existen tres β defensinas en el ganado bovino: el péptido antimicrobiano traqueal (PAT), péptido antimicrobiano lingual (PAL) y los péptidos antimicrobianos entéricos. PAT y PAL pueden formar poros en las membranas bacterianas, en virus envueltos y otros agentes microbianos resultando en una rápida lisis; pero también estas defensinas participan exacerbando procesos inflamatorios agudos y poseen propiedades quimiotácticas para células dendríticas. Las células epiteliales también producen ARNasa 7, la cual es una ARN helicasa con propiedades antimicrobianas, así como catelicidinas y proteínas surfactantes que contribuyen con la respuesta innata contra la infección (Ackermann *et al.*, 2010).

La producción de Interferón (IFN) tipo I es uno de los principales mediadores de la respuesta inmune contra virus en mamíferos, es entonces que los virus han desarrollado respuestas antagonistas de IFN. Generalmente los paramyxovirus codifican proteínas antagonistas de IFN provenientes de isoformas de proteínas

accesorias que se encuentran dentro de la secuencia de la proteína P. Estos antagonistas generalmente actúan sobre moléculas de señalización del sistema IFN, incluyendo el factor 5 asociado con la diferenciación de Melanoma (MDA5 (*Melanoma differentiation associated factor 5*)), el gen inducible por ácido retinóico-1 (RIG-1 (*Retinoic acid-inducible gene 1*)), el factor regulador de IFN 3 (IRF-3 (*IFN regulatory Factor 3*)) y proteínas de la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción 1 y 2 (STAT (*Signal transducers and activators of transcription*)) utilizando diferentes mecanismos, incluyendo la degradación proteosomal, inhibición de la fosforilación, entre otros (Audsley y Moseley, 2013) **(Figura 6).**

Para la transcripción de las proteínas accesorias la ARN polimerasa adiciona nucleótidos de guanina en los transcritos de ARNm del gen P, lo que provoca un desplazamiento del marco +1 o +2 bases dentro del ORF, lo que resulta en la generación de 2 o 3 proteínas accesorias (D/V/C), ya que la utilización de múltiples marcos de lectura conduce a la posibilidad de solapamiento de genes (Audsley y Moseley, 2013). Se desconoce la función que tiene la proteína accesoria D, sin embargo se ha descrito que las proteínas V y C tienen un efecto supresor en la producción de IFN- β (Komatsu *et al.*, 2007).

La detección de los componentes virales esta mediada por tres tipos de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs (*Pathogen associated molecular patterns*)) (RRPs): Receptores tipo Toll (TLRs (*Toll-like receptors*)) y receptores tipo RIG-1 (RLRs (*RIG like receptors*)) ya que son los receptores principales de la inducción de IFN tipo I (IFN α/β) y receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótidos. Los TLRs detectan ácidos nucleicos

virales: TLR3 detecta RNA de doble cadena, TLR7 detecta RNA de cadena simple ricos en guanina y uracilo. RLRs, RIG-1 y MDA5 detectan ARN de doble cadena en el citoplasma celular y finalmente RIG-1 también reconoce ARN de cadena simple (Ackermann *et al.*, 2010; Audsley y Moseley, 2013) (**Figura 6**).

Los RLRs y TLRs señalizan para la transcripción de IRF-3 y NF-κB, que al ser translocados al núcleo activan la transcripción de IFN tipo I, que a su vez estimula la expresión de IRF-7 y rutas alternas con TLR-9 (Audsley y Moseley, 2013).

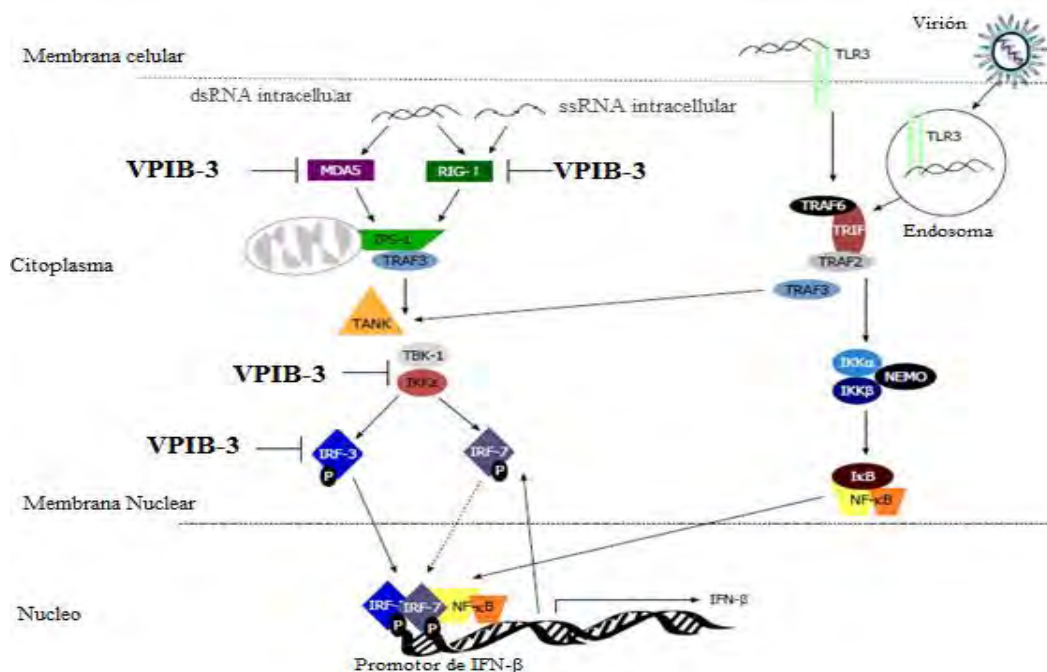


Figura 6. Mecanismos del BPIV-3 para evadir la respuesta inmune. (Modificado de Audsley y Moseley, 2013).

Finalmente se ha documentado que la infección por el BPIV-3 induce la producción de IgA en mucosas y, a nivel sistémico, IgM e IgG desde los seis días post infección y pueden persistir hasta por cinco meses en mucosas y por más tiempo a nivel sistémico. También se ha visto que los animales con títulos altos de IgA en mucosas tienen mayor protección contra la infección clínica. Se ha reportado que los

anticuerpos producidos reconocen de manera específica las proteínas HN, F y N del virión, además de que se pueden transferir por el calostro (Ellis, 2010).

Aunque se conoce poco acerca de la respuesta inmune celular; se sabe que las células NK tienen actividad citotóxica contra el virus, mientras que la proporción de linfocitos citotóxicos (T CD8⁺) circulantes es baja durante la infección. En experimentos hechos en otros miembros del género *Respirovirus* se ha visto que al final y durante la resolución de la infección hay un gran número de linfocitos CD8⁺ pulmonares (Ellis, 2010).

1.8. VACUNAS

Debido a que el BPIV-3 pertenece al CRB, las vacunas existentes son polivalentes en conjunto con otros agentes virales y bacterianos del complejo. Se administran múltiples vacunas comerciales con la finalidad de disminuir el riesgo y la gravedad del CRB. La selección del tipo y combinación de antígenos de la vacuna a utilizar se ven influenciados por el tipo y edad del ganado, origen, presencia previa de alguno de los patógenos del complejo, entre otros factores (Theurer *et al.*, 2015).

En Estados Unidos los resultados de la encuesta nacional de monitoreo en salud animal reportan que 95.1% de los corrales de engorda con más de mil cabezas de ganado vacunan contra BVDV, 93.2% contra BHV-1, 61.4% contra BRSV y 55.1% contra el BPIV-3 (Theurer *et al.*, 2015).

Las vacunas contra patógenos virales pueden contener virus vivo modificado (VVM) o antígenos virales inactivados. Las vacunas con VVM están reportadas como estimulantes de inmunidad celular y humoral, activando linfocitos T. Las vacunas de

antígenos inactivados (VAI) estimulan principalmente la respuesta humoral, aumentando la producción de células B y anticuerpos. Además, estas últimas necesitan de adyuvantes para generar una respuesta adecuada (Salt *et al.*, 2007; Theurer *et al.*, 2015). Muchas vacunas de VVM comercialmente disponibles pueden ser administradas parenteralmente o por vía intranasal (**Cuadro 2**).

Se ha demostrado que las vacunas que se administran por vía intranasal son más efectivas al inducir una respuesta inmune sistémica y local; además vacunar ganados jóvenes vía intranasal, puede intervenir potencialmente con los anticuerpos maternos, que en algunos casos interfieren con la inducción de inmunidad cuando se administran vacunas por la vía parenteral (Schmidt *et al.*, 2011; Mansoor *et al.*, 2015; Mahan *et al.*, 2016).

En el HPIV-3 se habla del uso de vacunas recombinantes, utilizando antígenos del virus humano, pero sustituyendo la Nucleoproteína por la de una cepa bovina, o utilizando las proteínas HN y F de las cepas humanas y el resto del genoma de la cepa bovina. Con esta vacuna se obtuvo una excelente producción de anticuerpos neutralizantes en niños seronegativos (Senchi *et al.*, 2013). Existen diversos artículos que reportan haber desarrollado diferentes tipos vacunas de subunidades contra el virus, por ejemplo, algunas vacunas emplean nanopartículas que encapsulan antígenos vacunales del virus que se administran por vía intranasal, en dichos estudios se ha reportado que dichas vacunas tienen una excelente producción de IgA neutralizantes a nivel de mucosas, sin embargo no tienen tan buena producción de IgG's a nivel sistémico como las vacunas parenterales comerciales (Mansoor *et al.*, 2014).

Cuadro 2. Vacunas comerciales disponibles en México que contienen al BPIV-3.

VACUNA	LABORATORIO	COMPONENTES	TIPO
ARSENAL®4.1	NOVARTIS	BPIV-3, BHV-1, BVDV-1 y BVDV-2	VVM
BAYOVAC BRSV VAC4	BAYER	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV-1 y BVDV-2	VVM
BAYOVAC HORIZON 9MR	BAYER	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV, <i>Leptospira canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. hardjo</i> , <i>L. pomona</i> y <i>L. icteriohaemorrhagiae</i> .	VVM
BOVIMUNE MASTER L5®	Lapisa	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV.	VVM
BOVIMUNE PROTECTOR®L5	Lapisa	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV.	VVM
BOVIRAL-3®	TORNEL	BPIV-3, BHV-1 (Cepa Colorado), BVDV-1 (Cepa NADL) y BVDV-2 (Cepa New York)	VAI
BOVI-SHIELD+ONE SHOT SQ	Pfizer	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV, <i>Manhemia haemolityca</i> A1	VVM
BOVI-SHIELD® GOLD FP5	Pfizer	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV-1 y BVDV-2	VVM
BOVI-SHIELD® GOLD FP5 L5TM	Pfizer	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV, <i>L. canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. hardjo</i> , <i>L. pomona</i> y <i>L. icteriohaemorrhagiae</i> .	VVM
CATTLEMASTER® GOLD FP5	Pfizer	BPIV-3, BHV-1, BVDV-1 y BVDV-2	VVM
ELITE® 9 Hs	Boehringer-Ingelheim	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV, <i>Histophilus somni</i> , <i>L. canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. hardjo</i> , <i>L. pomona</i> y <i>L. icteriohaemorrhagiae</i> .	VAI
EXPRESS® FP 10 Hs	Boehringer-Ingelheim	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV, <i>Histophilus somni</i> , <i>L. canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. hardjo</i> , <i>L. pomona</i> y <i>L. icteriohaemorrhagiae</i> .	VVM
EXPRESS® FP 5 Hs	Boehringer-Ingelheim	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV-1 y BVDV-2, <i>Histophilus somni</i> .	VVM
JENCINE 4®	INTERVET	BPIV-3, BHV-1, BRSV y BVDV-1	VVM
PYRAMID® 5 MLV	Boehringer-Ingelheim	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV-1 y BVDV-2	VVM
TITANIUM® 5	VIRBAC	BPIV-3 (Cepa Abbott), BHV-1 (Cepa RT-22 DK), BRSV (Cepa Lehmkuhl 375), BVDV-1 (Cepa Oregon C24V) y BVDV-2 (Cepa 296)	VVM
TRIANGLE® 9+ TIPO II BVD	Boehringer-Ingelheim	BPIV-3 (Cepa SF-4), BHV-3 (Cepa McKercher), BRSV (Cepa Diamond), BVDV-1 (Cepa Singer), BVDV-2 (Cepa 5912), <i>L. canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. hardjo</i> , <i>L. pomona</i> y <i>L. icteriohaemorrhagiae</i> .	VAI
VIRA SHIELD® 6+L5	NOVARTIS	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV-1, BVDV-2, <i>Leptospira canicola</i> , <i>L. grippotyphosa</i> , <i>L. hardjo</i> , <i>L. pomona</i> y <i>L. icteriohaemorrhagiae</i> .	VAI
VIRA SHIELD® 6+SOMNUS	NOVARTIS	BPIV-3, BHV-1, BRSV, BVDV-1 y BVDV-2, <i>Histophilus somni</i> .	VAI

Finalmente se ha descrito el uso de liposomas de oligomanosa (OML), ya que es un sistema natural y no tóxico de acarreamiento y transporte de antígenos; además el uso de OML representa un sistema eficaz que sirve como blanco para células presentadoras de antígeno, como los macrófagos y las células dendríticas cuando se administran por vía intranasal. En un estudio realizado utilizando OML en una vacuna para Parainfluenza humana se determinó que únicamente en presencia de un adyuvante de ARN de doble cadena sintético, Poly (I:C), la vacuna es capaz de producir una adecuada cantidad de anticuerpos neutralizantes tanto en suero como en mucosas (Senchi *et al.*, 2013).

1.9. HETEROGENEIDAD GENÉTICA Y EVOLUCIÓN MOLECULAR

1.9.1. GENOTIPOS VIRALES

Actualmente, ya se ha determinado la secuencia del genoma completo del BPIV-3 y basados en análisis filogenéticos se han descrito tres genotipos: A (BPIV3-A), B (BPIV3-B) y C (BPIV3-C) (**Figura 7**). Esto, debido a la acumulación de cambios a nivel genético que pueden conferir identidad y capacidades antigénicas diferentes a cada cepa. La variación entre estos aislados es limitada y tienen una identidad del 92% del total de nucleótidos del genoma completo entre genotipos, lo que refleja niveles similares de conservación parecidos a los de los aislados del virus humano (Horwood *et al.*, 2008; Ohkura *et al.*, 2013).

El BPIV3-A se ha reportado en ganado en Argentina, Australia, Brasil, China, Egipto, Japón y en Estados Unidos (Horwood *et al.*, 2008; Vaucher *et al.*, 2011; Maidana *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2012; Ohkura *et al.*, 2013; Neill *et al.*, 2015; Sobhy *et al.*, 2017). Este genotipo puede ser dividido en tres subgenotipos basados en el grado de

divergencia de las secuencias (Neill *et al.*, 2015; Sobhy *et al.*, 2017) (**Figura 7**). Se ha determinado que las variaciones entre las cepas pertenecientes a este genotipo son bajas, en promedio, analizando el genoma completo tienen una identidad nucleotídica del 92% (**Cuadro 3**).

Por otro lado, el BPIV3-B se ha reportado en ganado de Australia y Estados Unidos, además, en Argentina se ha podido aislar en Búfalos de agua y en ganado (Horwood *et al.*, 2008; Maidana *et al.*, 2012; Neill *et al.*, 2015; Fulton *et al.*, 2016). Se ha propuesto que este genotipo también forma tres subgrupos, donde las cepas aisladas en Estados Unidos constituyen el primer subgenotipo, las australianas el segundo genotipo y las cepas de los búfalos el tercer y último subgenotipo; aunque esto no ha sido confirmado ya que no se han hecho comparaciones filogenéticas aún (Neill *et al.*, 2015). Al comparar los genomas completos entre las cepas de este genotipo se observe una identidad nucleotídica del 92.7%. La identidad de nucleótidos de las cepas de referencia del BPIV3-B, fue de entre 82.6% y 83.9% al compararlas con secuencias del genotipo A y de 80.9% y hasta 88% al compararlas con secuencias del genotipo C (**Cuadro 3**).

El BPIV3-C es el más homogéneo de los genotipos y ha sido aislado en ganado en Argentina, China, Corea del sur, Estados Unidos y Japón (Zhu *et al.*, 2011; Maidana *et al.*, 2012; Oem *et al.*, 2013; Konishi *et al.*, 2014; Neill *et al.*, 2015). Las identidades de nucleótidos entre las cepas pertenecientes a este genotipo se encuentran entre 97.5% y hasta 98.1% y si se comparan los aminoácidos estas cepas llegan a presentar una identidad de hasta el 100%. Comparando este genotipo con el

genotipo A, se tiene una identidad de nucleótidos de entre 81.8% y hasta 87% (Cuadro 3) (Figuras 7 y 8).

Cuadro 3. Porcentajes de identidad de nucleótidos entre los genotipos del virus.

GENOTIPO	A	B	C
A	92%	*	*
B	82.6% - 83.9%	92.7%	*
C	81.8% - 87%	80.9% - 88%	97.5% - 98.1%

No se han realizado análisis para conocer las relaciones y porcentajes de identidad de nucleótidos, así como de aminoácidos entre subgenotipos aún, mismos que podrían ser útiles para determinar diferencias antigénicas entre estos grupos y subgrupos.

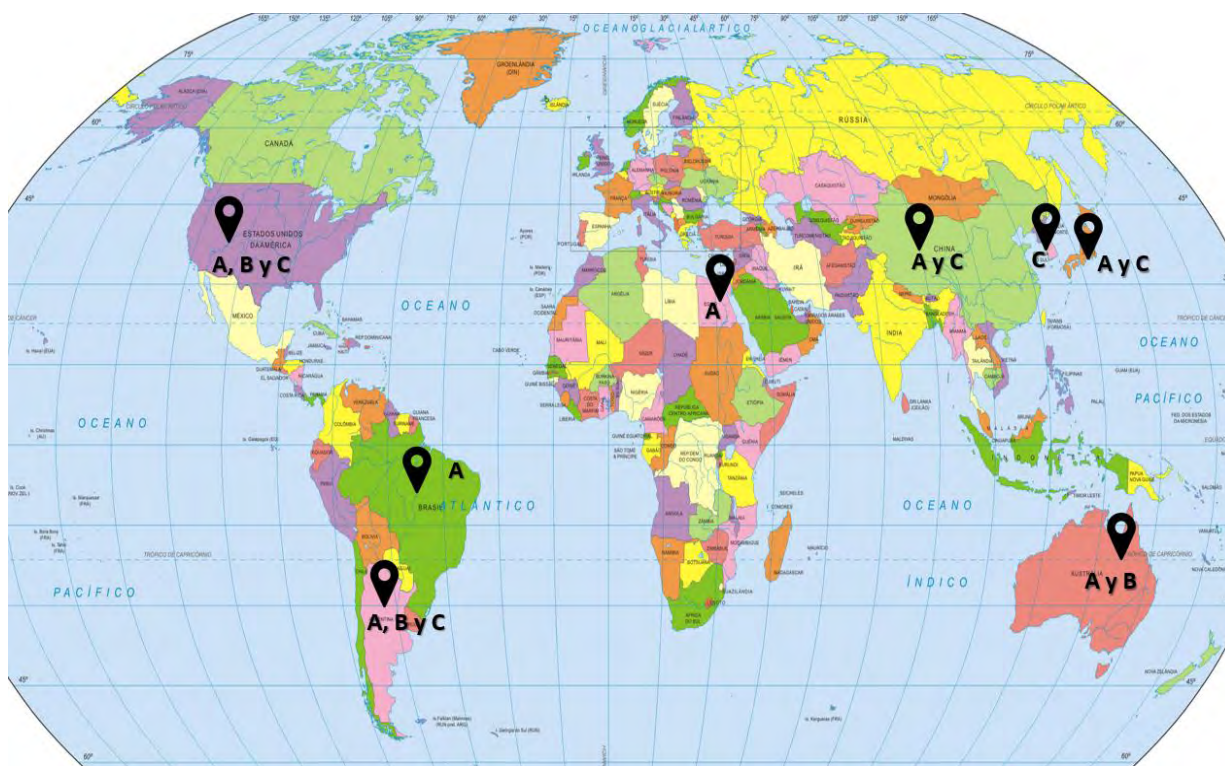


Figura 7. Distribución geográfica de los genotipos y subgenotipos de BPIV-3 previos a este estudio.

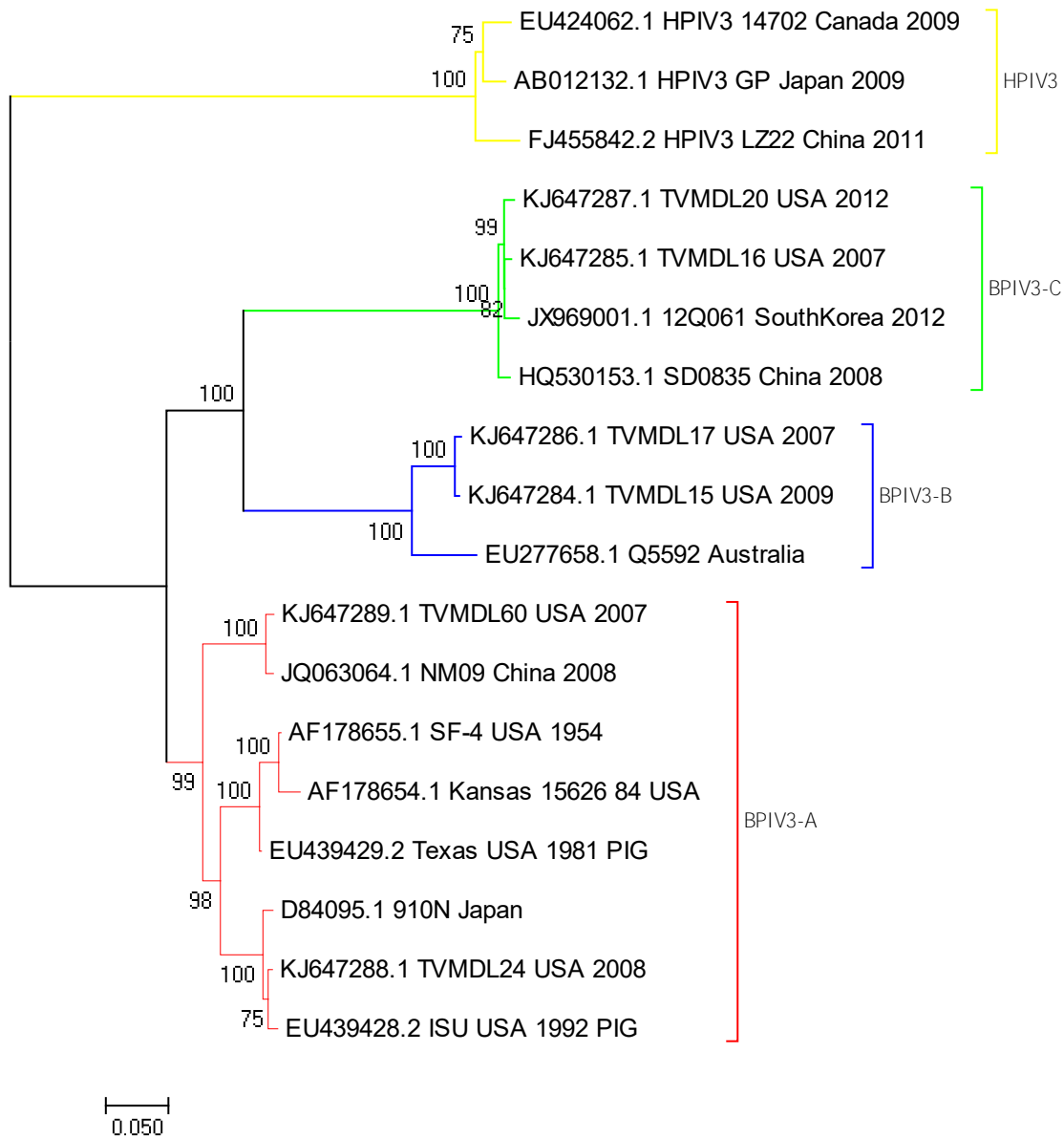


Figura 8. Árbol filogenético del BPIV-3. Se muestra la relación de los tres genotipos bovinos, comparándolos con algunas cepas de Parainfluenza-3 Humana (HPIV3), utilizando cepas de referencia (modificado de Neill *et al.*, 2015).

En un estudio realizado en 2008, comparando las secuencias de diferentes cepas aisladas se determinó que los cambios en los genotipos se pueden detectar principalmente en el gen de la proteína M por variaciones en el gen, pero también en la secuencia de las proteínas F y HN (Horwood *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011; Oem *et al.*, 2013; Neill *et al.*, 2015) (**Figura 9**).

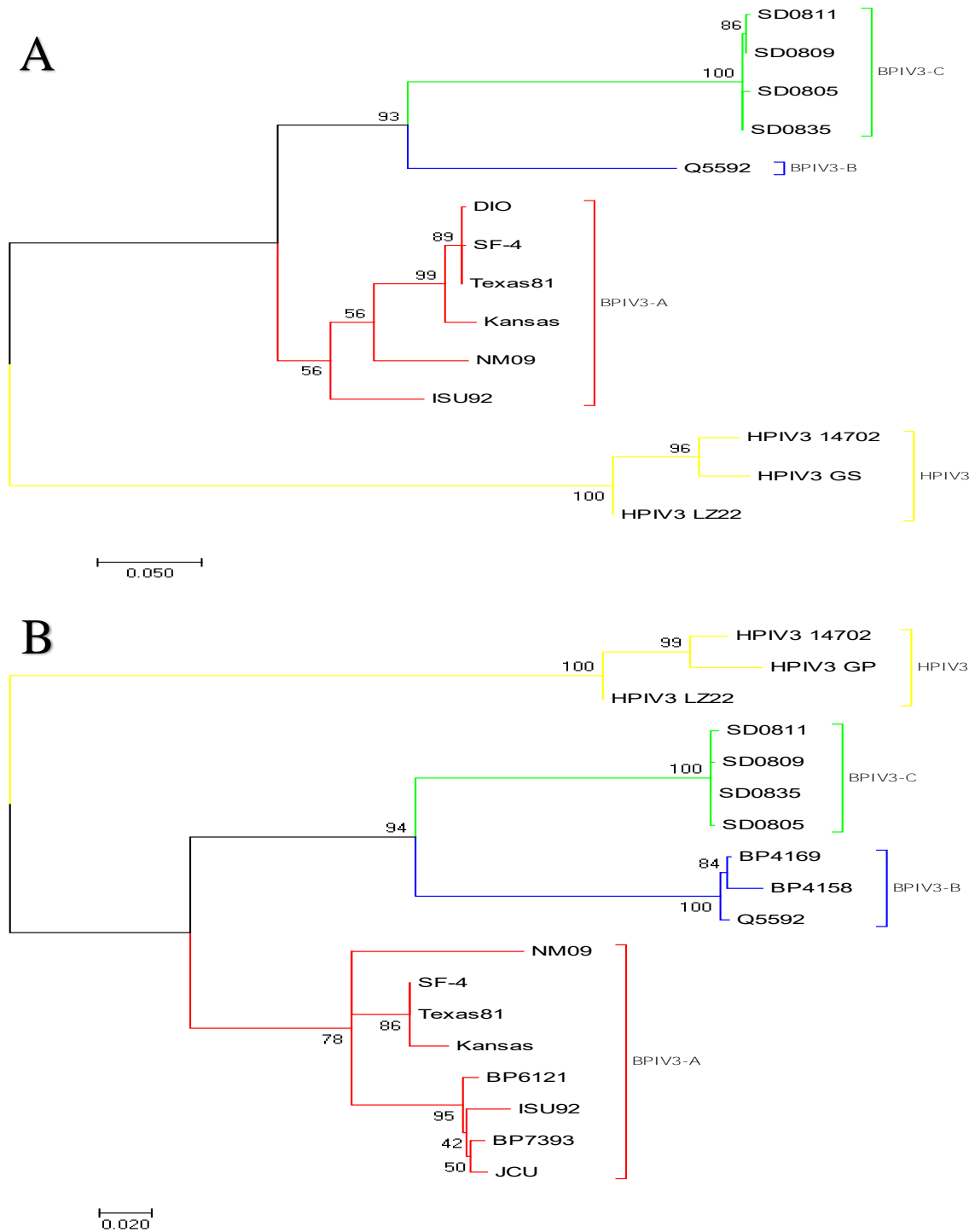


Figura 9. Árbol de análisis filogenético donde se muestran los tres genotipos del BPIV-3 utilizando secuencias reportadas en el GenBank (modificado de Wen *et al.*, 2012.). **A)** Utilizando la secuencia de nucleótidos del gen HN, **B)** Utilizando la secuencia de nucleótidos del gen M (En ambos casos podemos apreciar los 3 genotipos).

Estudios previos muestran que hay similitud en los determinantes antigénicos de la proteína N entre las cepas humanas y las cepas bovinas; pero las diferencias antigénicas entre los 3 genotipos siguen sin conocerse y son de vital importancia para conocer epítomos conservados de cada genotipo para diseñar mejores técnicas de diagnóstico, nuevas estrategias terapéuticas y de profilaxis vacunal. En un estudio realizado en 2015, se caracterizaron los determinantes antigénicos de la proteína N, se utilizaron vectores de expresión para que un fragmento de la proteína se expresara en *Escherichia coli* y utilizando anticuerpos monoclonales se identificaron 3 epítomos: el primero que va del aminoácido (aa) 91 al 102, el cual es el más conservado ya que se encuentra en los tres genotipos y en las cepas humanas, el segundo epítomo se encontró del aa 407 al 413, el cual es menos conservado que el primero y se encuentra en las cepas de los genotipos A, C y en las cepas humanas, pero no en el genotipo B. Finalmente el tercer epítomo, se encontró del aa 428 al 435, es el menos conservado ya que solo se encuentra en los genotipos A y C. Dichos resultados sugieren que existe variación antigénica en los 3 genotipos no solamente en la proteína N sino también en otras proteínas virales (Ren *et al.*, 2015).

1.9.2. EVOLUCIÓN VIRAL

La secuenciación masiva y los análisis filogenéticos son herramientas que nos ayudan a estimar el origen de una nueva cepa, a identificar mutaciones y los efectos de estas en la virulencia y transmisión de los virus, también nos ayudan a predecir la aparición de nuevas especies, a elucidar los mecanismos de la transmisión entre especies, identificar procesos de recombinación, interacciones entre virus,

mecanismos de propagación, tamaño de la población viral, el origen de una cepa en regiones geográficas concretas y cómo las personas pueden contribuir con la transmisión de una enfermedad (Yang *et al.*, 2008; Sintchenko y Holmes, 2015).

En virus ARN, la aparición de mutaciones puntuales por parte de la ARN polimerasa es el principal elemento que contribuye con la alta variabilidad genética, ya que estos virus carecen de mecanismos de corrección y reparación de errores. La tasa de mutación promedio en estos virus es de 10^{-4} a 10^{-5} errores por nucleótido, por lo que el número de errores varía dependiendo de la longitud del genoma. (Presloid y Novella, 2015). Sin embargo, los virus de la familia *Paramyxoviridae* poseen un genoma de tamaño polyhexamérico que se considera que previene eventos de hypermutagénesis. Además, de dicho fenómeno, presentan mecanismos de mutación, deriva génica, recombinación y selección natural, mismos que se cree que participan en la evolución genética del BPIV-3. Sumado a esto, los genomas pequeños, ciclos de replicación cortos, poblaciones grandes y la generación de quasiespecies, que pueden perderse o ser seleccionadas en presencia de eventos ambientales tales como drogas antivirales o anticuerpos, son factores que hacen altamente variable este virus (Belshaw *et al.*, 2007; Han y Worobey, 2011; Domingo *et al.*, 2012).

Aunque las mutaciones son la principal fuente de variación genética, la recombinación puede actuar modificando la estructura genética de las poblaciones virales. Existen dos mecanismos que pueden generar genomas virales recombinantes. El reordenamiento de genes, que puede ocurrir cuando 2 o más virus coinfectan una misma célula e intercambian segmentos de ARN para formar

nueva progenie viral; fenómeno que podemos ver en virus segmentados como los Virus de Influenza. Y la recombinación, que es el intercambio intramolecular de información genética entre dos secuencias de nucleótidos. Los eventos de recombinación pueden ocurrir entre diferentes genes (recombinación intergénica o no-homóloga) o entre alelos del mismo gen (recombinación intragénica u homóloga). La recombinación homóloga es un fenómeno poco común en virus de ARN de sentido negativo, existen muy pocos reportes de dicho fenómeno en estos virus y en su mayoría se han reportado en miembros de la familia *Paramyxoviridae* (Han y Worobey, 2011). Aunque, actualmente no se sabe si la recombinación forma parte de los mecanismos evolutivos del BPIV-3.

Dentro de los tres genotipos descritos se han reportado variaciones genéticas de distintos tipos, desde el tamaño de los genomas, alta variación en las regiones no traducibles, así como mutaciones puntuales en la secuencia leader y en los genes F, L y P principalmente, con cambios significativos en las secuencias de aminoácidos. Existen diferentes reportes que describen al gen P como el más variable entre los tres genotipos (Horwood *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011; Oem *et al.*, 2013; Ohkura *et al.*, 2013).

Pocas cepas han sido secuenciadas en su totalidad, lo que dificulta la evaluación de la variación genética del virus, lo que nos podrá brindar información relevante y útil para afrontar la enfermedad. Se ha propuesto que la variación genética del virus se debe en gran medida a la transmisión del virus entre especies ya que ha sido reportada en diferentes especies, incluyendo cerdos, pequeños rumiantes como las cabras, borregos, alpacas y recientemente en búfalos, sugiriendo que la transmisión

entre especies es de vital importancia en la evolución de este virus; aunque esto no ha sido confirmado (Yener *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2009, 2010; Maidana *et al.*, 2012; Chakraborty *et al.*, 2014). En un estudio se explica que el dominio de unión al receptor de la proteína HN se puede adaptar a análogos de ácido siálico en distintos hospederos, lo que facilita el cambio de tropismo celular haciendo que surjan nuevos hospederos; lo que puede explicar parte de la evolución molecular del BPIV-3 y la facilidad con la que pueden ocurrir las infecciones entre especies (Bowden *et al.*, 2010).

Neill *et al.*, ha propuesto que dos cepas de baja patogenicidad en cerdos (TX81 e ISU92) se transfirieron del ganado bovino a los cerdos, siendo TX81 el mismo virus que circula tanto en bovinos como en cerdos, a lo que se le conoce como transferencia verdadera y la cepa ISU92 es un nuevo virus adaptado al cerdo y considerado una subespecie del virus del ganado bovino (Neill *et al.*, 2015). Debido a esta información se ha cuestionado el rol de los búfalos, cerdos y pequeños rumiantes en la transmisión y como reservorios del virus. Además, factores como la exportación e importación de ganado, productos cárnicos y derivados contaminados, la utilización de materiales para la realización de productos para la salud contaminados con el virus (principalmente vacunas) o la aplicación de una vacuna que posea genotipos o subgenotipos que no se encuentran dentro de una región geográfica específica, representan un posible riesgo de introducir un nuevo virus y sus posibles mutaciones en la población animal susceptible (Wen *et al.*, 2012).

En el BPIV-3 las variaciones entre los aislados son limitadas, sus genotipos tienen identidades de hasta el 92 % del total de nucleótidos, esto debido a que, las características de su genoma prevén eventos de hypermutagenesis lo que hace que las secuencias del virus tengan un alto nivel de conservación, por lo que se debe sospechar que el virus debe tener otros mecanismos evolutivos. La recombinación puede actuar modificando la estructura genética de las poblaciones virales, puede ser favorecida por la transmisión entre especies y además ha sido reportada en otros virus miembros de la familia *Paramyxoviridae*. Entonces, ¿La recombinación forma parte de los mecanismos evolutivos del virus? ¿Este mecanismo se favorecerá por eventos de transmisión entre especies?

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia clínica y económica del BPIV-3 como parte del CRB, es importante conocer los genotipos y subgenotipos existentes del virus, así como sus mecanismos evolutivos para poder entender mejor la epidemiología molecular del mismo y poder guiar el diseño de vacunas, el desarrollo de mejores técnicas de diagnóstico, así como de mejores tratamientos.

Debido a que la recombinación puede actuar modificando la estructura genética de las poblaciones virales, puede ser favorecida por la transmisión entre especies y además ha sido reportada en otros virus miembros de la familia *Paramyxoviridae*, se debe estudiar si la recombinación forma parte de los mecanismos evolutivos del BPIV-3.

3. HIPÓTESIS

La recombinación es un mecanismo evolutivo presente en el virus de Parainfluenza-3 bovina.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar las secuencias disponibles del virus, profundizando en la epidemiología molecular y en los mecanismos evolutivos del mismo.

4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las relaciones filogenéticas entre genotipos y subgenotipos, a partir de secuencias reportadas.
2. Hacer la reconstrucción filogeográfica del virus para elucidar la dinámica de distribución mundial de los genotipos y subgenotipos de secuencias reportadas.
3. Determinar si la recombinación es un mecanismo evolutivo del virus.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. RECOPIACIÓN Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS REPORTADAS.

Para poder llevar a cabo la caracterización molecular del virus, se realizó una búsqueda de secuencias completas, así como de secuencias de cada gen del virus, totales y parciales, reportadas en NCBI (National Center for Biotechnology information), en EMBL (European Molecular Biology Laboratory) y en ViPR (Virus Pathogen Database and Analysis Resource). También se llevó a cabo una búsqueda haciendo uso de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para completar la colección de secuencias para analizar. Dicha búsqueda, contempló únicamente secuencias nucleotídicas y se trabajaron en formato FASTA. Además, se recopiló información del país de origen de cada aislamiento y el año de colección de la muestra. Para editar, modificar o renombrar una o más secuencias se utilizaron los programas BioEdit (Hall, 1999), MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016), el Bash de Ubuntu en Windows y CygWin64.

Del total de las secuencias reportadas del virus se eliminaron las secuencias de cepas vacunales y secuencias idénticas. Se realizó la caracterización con 22 secuencias de genomas completos del virus (SGC) y por cada gen se utilizaron el siguiente número de secuencias: F-53, HN-69, M-30, N-60 y P-15. El número de acceso, el nombre del aislado o cepa, el tamaño de la secuencia, la fecha de colección, el hospedador y el país de origen de las SGC se encuentran detallados en el **Cuadro 4**. La misma información para las secuencias por genes se encuentra detallada en el **Anexo 1**. Todas las secuencias se alinearon utilizando el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

Cuadro 4. Secuencias de genoma completo de BPIV-3 utilizadas en este trabajo.

No. de acceso GenBank	Nombre de la Cepa	Tamaño secuencia	Fecha de colección	Hospedero	País
AB770484	BN-1	15480	1963	Bovino	Japón
AF178654	Kansas/15626/84	15456	Desconocido	Desconocido	EUA
AF178655	Shipping Fever	15456	1954	Bovino	EUA
D84095	910N	15480	Desconocido	Desconocido	Japón
EU277658	Q5592	15498	Desconocido	Desconocido	Australia
HQ530153	SD0835	15474	2008	Bovino	China
JQ063064	NM09	15456	2008	Bovino	China
JX969001	12Q061	15474	01/10/2012	Bovino	Corea del sur
KJ647284	TVMDL15	15474	2009	Bovino	EUA
KJ647285	TVMDL16	15474	2007	Bovino	EUA
KJ647286	TVMDL17	15474	2007	Bovino	EUA
KJ647287	TVMDL20	15474	2012	Bovino	EUA
KJ647288	TVMDL24	15480	2008	Bovino	EUA
KJ647289	TVMDL60	15456	2007	Bovino	EUA
KP757872	3/Egypt/2014	15434	2014	Bovino	Egipto
KP764763	TtPIV-1	15474	Desconocido	Delfin	EUA
KT071671	NX49	15474	2014	Bovino	China
KT215610	JS2013	15618	12/01/2013	Cabra	China
KU198929	XJA13	15474	nov-13	Bovino	China
LC000638	HS9	15474	2012	Desconocido	Japón
LC040886	FK/D56/13	15480	nov-13	Bovino	Japón
EU439428.2	92-7783 ISU-92	15480	1992	Cerdo	EUA
EU439429.2	81-19252_Texas-81	15480	1981	Cerdo	EUA

5.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para poder analizar filogenéticamente al virus se utilizó el programa IQ-TREE y utilizando el Model Finder de dicho programa (Kalyaanamoorthy et al., 2017) se determinaron los modelos de sustitución que fueron utilizados para realizar los análisis filogenéticos según los siguientes parámetros: Para las SGC se utilizó el método General Time Reversible (GTR) (Rodriguez et al., 1990) con distribución gamma (G) y la proporción de sitios invariables (I) y una constante de IQ-TREE Model Finder (f). Para el análisis de las secuencias del gen F, también se utilizó GTR pero con distintas variables, para el gen HN, se utilizó el método Kimura de 3 parámetros (K3Pu) (Kimura, 1981), para el gen M se utilizó el método Tamura-Nei (TN) (Tamura y Nei, 1993) y finalmente, para los genes N y P se volvió a utilizar

GTR (**Cuadro 5**). Para calcular las distancias entre pares de secuencia, así como para realizar búsquedas con métodos basados en máxima verosimilitud es necesario especificar un modelo de evolución para los datos, por tal motivo se selecciona el modelo que mejor describa para cada uno de los sitios de la matriz de las secuencias la probabilidad de que una secuencia de nucleótidos cambie a otra secuencia homóloga a lo largo del tiempo; lo que resulta indispensable para tener una reconstrucción filogenética robusta y fiable.

La inferencia genética se estimó por Máxima Verosimilitud ((ML) *Maximum Likelihood*) (Fu y Li, 1993; Guindon y Gascuel, 2003) en IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2015), empleando el *Ultrafast Bootstrap* (Minh *et al.*, 2013; Hoang *et al.*, 2017), como método de soporte estadístico, utilizando 1000 réplicas. Se utilizó una cepa de Parainfluenza-3 Caprina (CPIV-3) como “*out-group*” o grupo no relacionado evolutivamente para enraizar el árbol en todos los modelos (Número de Acceso GenBank: KT215610.1).

Cuadro 5. Modelos de sustitución empleados para el análisis filogenético.

SECUENCIAS	MODELO	SECUENCIAS ANALIZADAS
SGC	GTR+f+l+G4	22
F	GTR+f+R3	75
HN	K3Pu+f+R2	91
M	TN+f+l	52
N	GTR+f+G4	82
P	GTR+f+G4	37

Con el objetivo de analizar el soporte de las ramas internas de cada árbol se llevó a cabo un análisis de mapeo de Verosimilitud ((LM) *Likelihood mapping*) (Strimmer y Von Haeseler, 1997), dentro de IQ-TREE. Se verificó que todas las ramas tuvieran un porcentaje alto (>75%) de la topología resuelta, las secuencias que por el

contrario tenían altos porcentajes de topología irresoluta se eliminaron; en estos casos se vuelve a hacer el análisis filogenético sin dichas secuencias. Todos los árboles filogenéticos generados se editaron en MEGA 7.0.

5.3. ANÁLISIS DE RECOMBINACIÓN

5.3.1. PRUEBA DE TOPOLOGÍA

Con el objetivo de detectar algún proceso de recombinación en las secuencias analizadas se llevó a cabo una prueba de topología ((TT) *Topology test*), de igual manera dentro de IQ-TREE. Para poder realizar esta prueba se alinearon las SGC por gen, utilizando ClustalW y se generó un árbol para cada gen por ML utilizando el *Ultrafast Bootstrap* con 10,000 repeticiones. Este mismo procedimiento se llevó a cabo para cada gen, ocupando las secuencias en común entre dos genes en las 10 posibles combinaciones (F-HN, F-M, F-N, F-P, HN-M, HN-N, HN-P, M-N, M-P and N-P). Empleando los árboles generados se corrió el TT, con el objetivo de comparar la topología del árbol de cada gen entre sí y con el árbol de las SGC utilizando las siguientes pruebas: Shimodaira-Hasegawa (SH) (Shimodaira y Hasegawa, 1999), Kishino Hasegawa (KH) (Kishino y Hasegawa, 1989), Shimodaira (AU) (Shimodaira, 2002) y los pesos de verosimilitud esperados ((ELW) *Expected Likelihood weights*) (Strimmer y Rambaut, 2002). Estas pruebas confirmaron la diferencia estadística entre los árboles filogenéticos estimados a partir de los diferentes genes. La significancia estadística se estableció en $p < 0.01$ en todas las pruebas. Todos los análisis se realizaron por triplicado. El CPIV-3 se utilizó como *outgroup* en todos los modelos, junto con algunas secuencias del HPIV-3 (Números de acceso de GenBank: EU424062.1, AB012132.1, FJ455842.2, KF687346.1 y KF530245.1) para

descartar que los resultados de incongruencia obtenidos con esta prueba fueran a causa de la secuencia *outgroup*.

5.3.2. IDENTIFICACIÓN DE PROCESOS DE RECOMBINACIÓN

Para poder confirmar e identificar los posibles procesos de recombinación a los que aludió el TT, se utilizó el programa RDP4, empleando los siguientes 7 métodos algorítmicos para identificar dichos procesos: RDP (Martin y Rybicki, 2000), GENECONV (Padidam *et al.*, 1999), *Bootscan* (Martin *et al.*, 2005), MaxChin (Maynard Smith, 1992), Chimaera (Posada y Crandall, 2001), SiScan (Gibbs *et al.*, 2000) y 3Seq (Boni *et al.*, 2007). Todos los análisis se realizaron por triplicado. Se tomaron como positivas las secuencias que tuvieran 5 o más métodos positivos a recombinación.

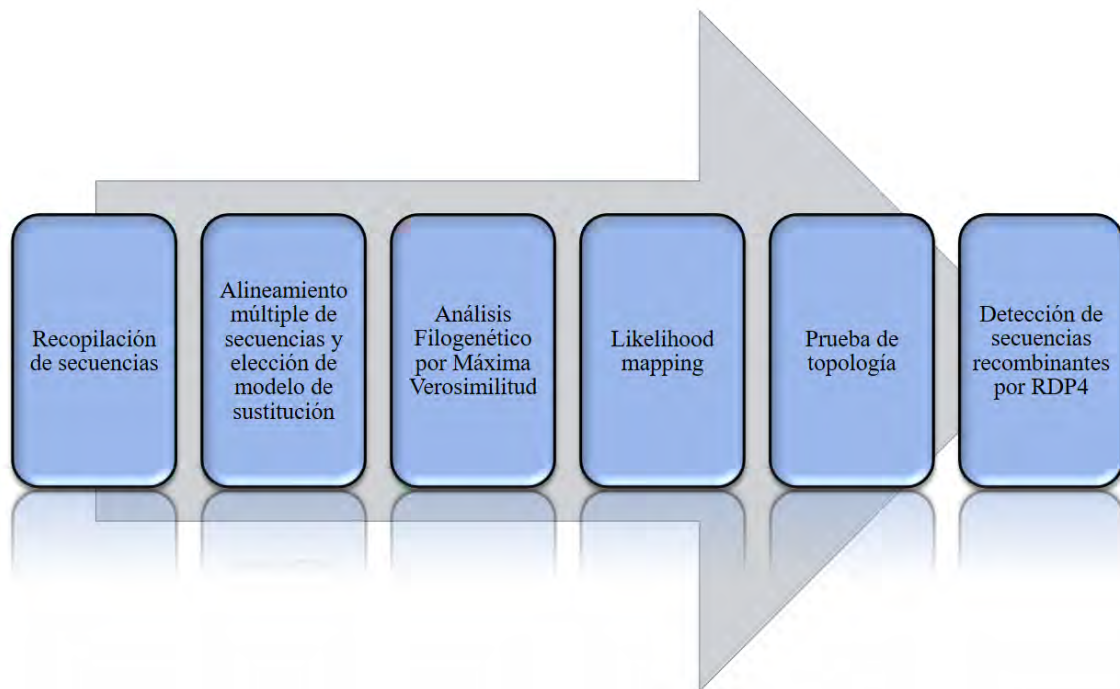


Figura 10. Diagrama de flujo general de la metodología utilizada a lo largo del proyecto.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para conocer la relación genética existente entre los BPIV-3 reportados, se construyeron 6 árboles filogenéticos basados en las secuencias disponibles de los genes F, HN, M, N y P, además, de las SGC. Utilizando estas últimas, se determinaron los genotipos y subgenotipos existentes del virus; confirmando los tres genotipos previamente descritos: BPIV3-A, BPIV3-B y BPIV3-C. Además de los tres subgenotipos de BPIV3-A, descritos previamente. Revelando que el BPIV3-B puede dividirse en dos subgenotipos y confirmando que el BPIV3-C es el genotipo más homogéneo, al no subdividirse (**Figura 11**).

No se encontraron relaciones geográficas sólidas, ligadas a un genotipo o subgenotipo en este grupo de secuencias y se puede observar que el virus ha sido aislado de diferentes hospederos, como cerdos y delfines, que mantienen una relación genética estrecha con los virus aislados en ganado bovino.

Para confirmar los genotipos y subgenotipos por genes, se construyó un árbol para cada uno de estos, obteniendo los mismos genotipos para el gen F (**Figura 12**).

Para los genes HN, M, N y P se obtuvieron los mismos genotipos, más un subgenotipo hipotético de BPIV3-A, que se denominó A4 y que se propone como cuarto subgenotipo, hasta que se pueda confirmar, ya que no se cuenta con las secuencias completas de dichos aislados japoneses, concernientes a la región de Akkeshi (Números de acceso GenBank: LC170488.1 y LC170489 (HN), LC 170481.1 y LC170482.1 (M, N y P)) (**Figuras 13, 14, 15 y 16**).

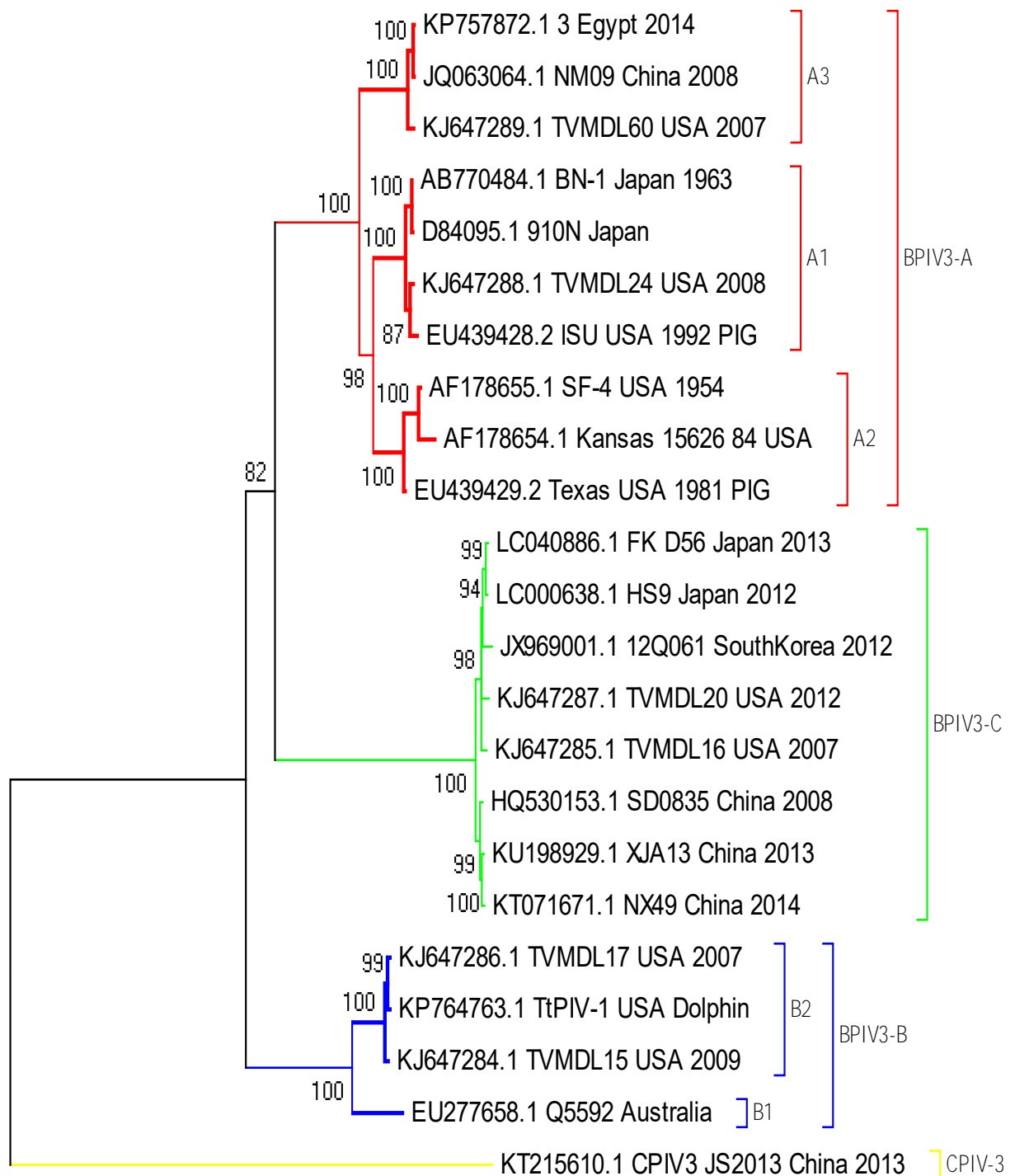


Figura 11. Análisis filogenético del BPIV-3 basado en las SGC reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. Se indica el número de acceso, nombre de la cepa, país de origen, especie (excepto ganado bovino) y año de colección de la muestra.

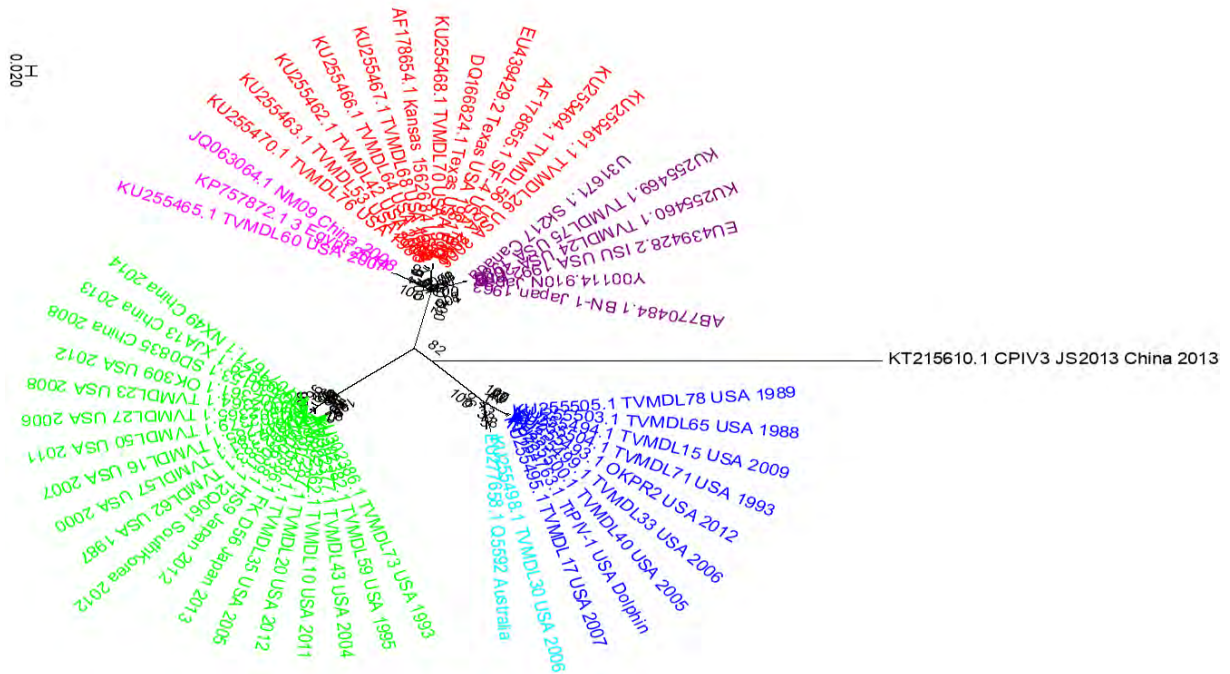


Figura 12. Análisis filogenético del gen F del BPIV-3 basado en las secuencias de este gen reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. (BPIV3-A: A1 (Púrpura), A2 (Rojo), A3 (Fucsia); BPVI3-B: B1 (Aguamarina), A2 (Azul); BPIV3-C (Verde)). n=51

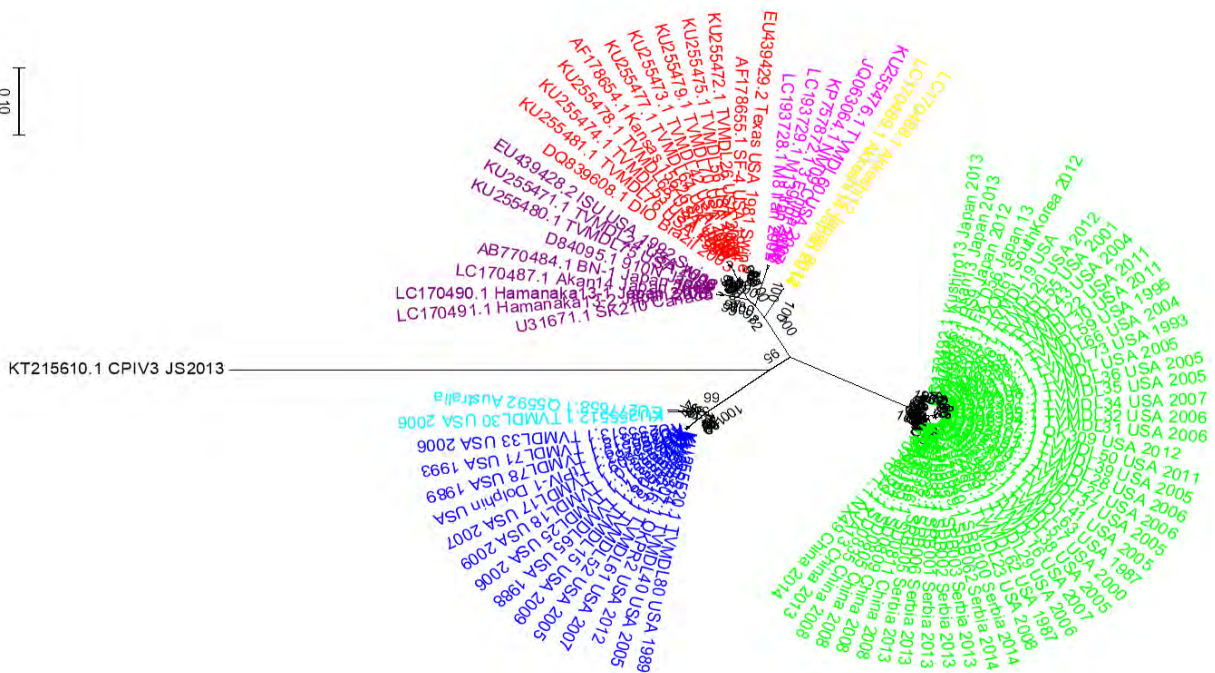


Figura 13. Análisis filogenético del gen HN del BPIV-3 basado en las secuencias de este gen reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. (BPIV3-A: A1 (Púrpura), A2 (Rojo), A3 (Fucsia); BPVI3-B: B1 (Aguamarina), A2 (Azul); BPIV3-C (Verde)) Además muestra el subgenotipo hipotético A4 (Amarillo). n=75

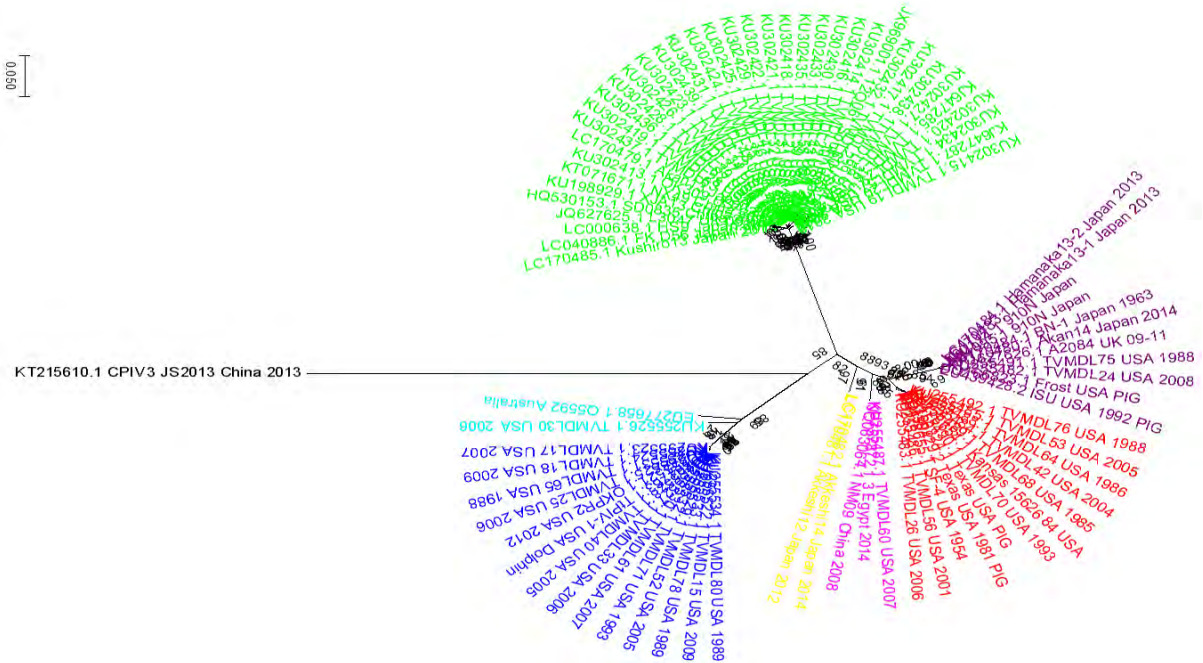


Figura 14. Análisis filogenético del gen N del BPIV-3 basado en las secuencias de este gen reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. (BPIV3-A: A1(Púrpura), A2 (Rojo), A3 (Fucsia); BPVI3-B: B1 (Aguamarina), A2 (Azul); BPIV3-C (Verde)) Además muestra el subgenotipo hipotético A4 (Amarillo). n=82

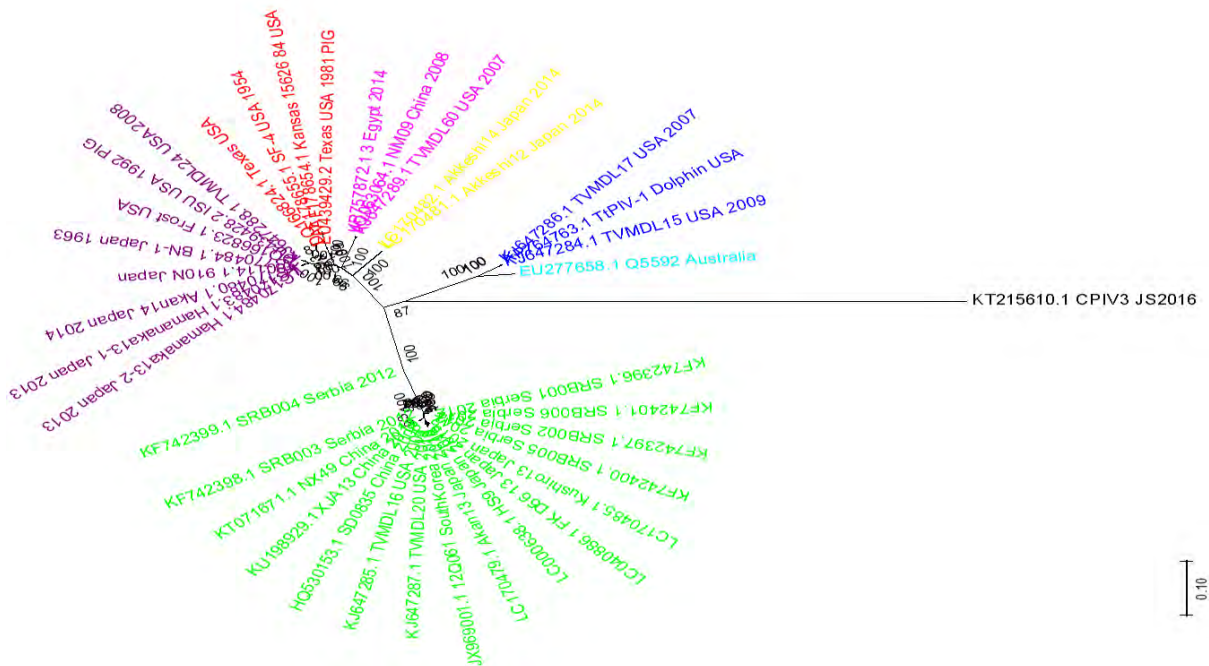


Figura 15. Análisis filogenético del gen P del BPIV-3 basado en las secuencias de este gen reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. (BPIV3-A: A1(Púrpura), A2 (Rojo), A3 (Fucsia); BPVI3-B: B1 (Aguamarina), A2 (Azul); BPIV3-C (Verde)) Además muestra el subgenotipo hipotético A4 (Amarillo). n=37

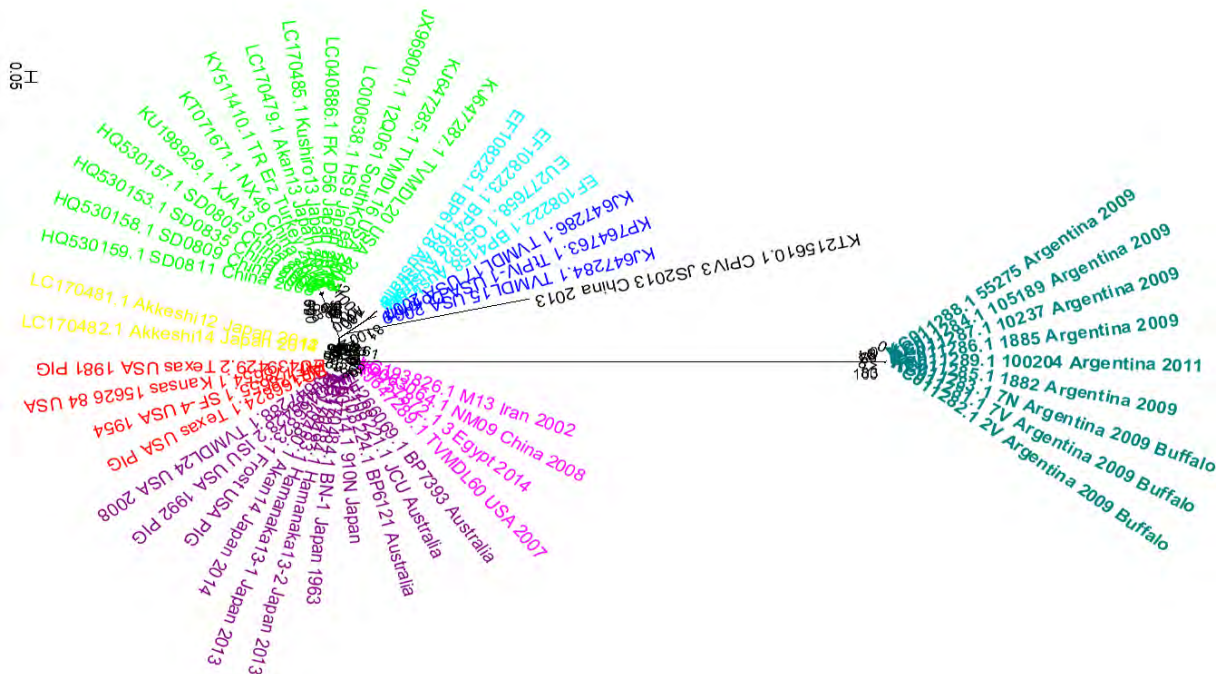


Figura 16. Análisis filogenético del gen M del BPIV-3 basado en las secuencias de este gen reportadas en GenBank. El árbol fue construido por el método de Máxima Verosimilitud. El árbol muestra los tres genotipos y sus respectivos subgenotipos. (BPIV3-A: A1(Púrpura), A2 (Rojo), A3 (Fucsia); BPVI3-B: B1 (Aguamarina), A2 (Azul); BPIV3-C (Verde)) Además muestra el subgenotipo hipotético A4 (Amarillo). En Verde azulado, se muestran las secuencias argentinas, que se encuentran filogenéticamente muy alejadas del resto de las secuencias de BPIV-3. n=52

Finalmente, al generar el análisis filogenético de las secuencias disponibles para el gen M, se pudo detectar una irregularidad en las secuencias reportadas en búfalos y ganado bovino en Argentina (Maidana *et al.*, 2012). En dicho reporte se argumenta que dichas secuencias se encuentran distribuidas a lo largo de los tres genotipos del virus, pero al analizar las mismas secuencias en este estudio, las secuencias argentinas se encuentran muy alejadas genéticamente de los miembros del género *Respirovirus* (**Figura 16**). Por lo que esto puede deberse a un error en los análisis filogenéticos realizados en el estudio argentino o hubo una falla al momento de ingresar las secuencias a la base de datos del GenBank.

El LM es un método para analizar el soporte de las ramas internas en un árbol sin tener que computar el árbol completo. Este se realiza si se está interesado en la relación entre grupos. Cada rama interna en un árbol completamente resuelto define para cuatro conjuntos de secuencias. Esta prueba se realiza para confirmar que cada secuencia (rama) se encuentre en el genotipo correspondiente. Los resultados del LM se muestran en el **Cuadro 6**.

Cuadro 6. Resultados de la prueba de LM.

GEN	PORCENTAJE PROMEDIO DE SOPORTE DE CUARTETOS POR REGIONES			PORCENTAJE PROMEDIO DE SOPORTE DE CUARTETOS POR AREAS							
	a1	a2	a3	RESUELTO			PARCIALMENTE RESUELTO			NO RESUELTO	% TOTAL RESUELTO
				1	2	3	4	5	6	7	
SGC	37.81	28.76	33.43	36.6	27.89	32.58	0.67	0.44	0.76	1.06	97.07
F	43.73	22.5	33.77	34.84	10.95	22.84	0.55	0.73	0.7	29.4	68.63
HN	43.26	21.25	35.49	35.08	13.75	28.34	1.13	0.99	1.24	19.46	77.17
M	36.87	28.75	34.38	18.61	12.63	17.81	2.19	2.32	1.48	44.97	49.05
N	42.49	20.94	36.57	27.25	10.56	23.68	0.66	0.5	0.81	36.54	61.49
P	37.67	30.53	31.8	27.58	22.66	24.24	0.96	1.43	1	22.14	74.48

La división del mapeo de probabilidad traza en 3 o 7 áreas. A la izquierda (a1, a2, a3), las áreas muestran soporte para una de las diferentes agrupaciones como (a, b | c, d). A la derecha (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), los cuartetos correctos que caen en las áreas 1, 2 y 3 son filogenéticamente informativos. Los que están en los rectángulos 4, 5 y 6 son parcialmente informativos y aquellos en el centro (7) no son informativos. Las secuencias a, b, c, d se extraen de todas las secuencias incluidas.

Como parte de los resultados de dichos análisis se puede deducir que el BPIV3-A es un genotipo presente en Australia (A1), Brasil (A2), Canadá (A1), China (A3), Egipto (A3), Estados Unidos (A1, A2 y A3), Irán, (A3), Japón (A1 y "A4") y Reino

Unido (A1). El BPIV3-B está presente en Australia (B1) y en Estados Unidos (B1 y B2). Finalmente, el BPIV3-C se encuentra presente en China, Corea del Sur, Japón, Estados Unidos, Reino Unido, Serbia y Turquía (**Figura 17**). No se pudo confirmar que las cepas argentinas fueran correspondientes con el BPIV-3.



Figura 17. Distribución geográfica de los genotipos y subgenotipos de BPIV-3 a partir de las secuencias reportadas en el GenBank.

6.2. ANÁLISIS DE RECOMBINACIÓN

6.2.1. PRUEBA DE TOPOLOGÍA

Esta prueba se realizó con cada gen de las SGC, pero también con combinaciones entre las secuencias de los genes por separado, en el TT se buscan incongruencias en las ramas, al comparar los árboles de cada gen entre sí y con el árbol de las SGC. Las incongruencias se encontraron en la topología del árbol generado por el gen L con respecto del resto de los genes y de igual manera en el árbol de las SGC

con el resto de los genes (**Cuadro 7**). Al comparar las secuencias de genes por pares no se encontró ninguna incongruencia en la topología de los árboles.

Cuadro 7. Resultados de la prueba de topología.

	F	HN	L	M	N	P	SGC
F	1	congruente p>0.01	Incongruente p<0.01	congruente p>0.01	congruente p>0.01	congruente p>0.01	congruente p>0.01
HN	congruente p>0.01	1	Incongruente p<0.01	congruente p>0.01	congruente p>0.01	congruente p>0.01	congruente p>0.01
L	Incongruente p<0.01	Incongruente p<0.01	1	Incongruente p<0.01	Incongruente p<0.01	Incongruente p<0.01	Incongruente p<0.01
M	congruente p>0.01	congruente p>0.01	Incongruente p<0.01	1	congruente p>0.01	congruente p>0.01	congruente p>0.01
N	congruente p>0.01	congruente p>0.01	Incongruente p<0.01	congruente p>0.01	1	congruente p>0.01	congruente p>0.01
P	congruente p>0.01	congruente p>0.01	Incongruente p<0.01	congruente p>0.01	congruente p>0.01	1	Incongruente p<0.01
SGC	Incongruente p<0.01	Incongruente p<0.01	Incongruente p<0.01	Incongruente p<0.01	Incongruente p<0.01	Incongruente p<0.01	1

Podemos ver que la incongruencia se presenta únicamente en el gen L y en las SGC con respecto del resto de los genes.

Al presentarse incongruencia en el gen L, se explica la incongruencia del árbol de SGC debido a que el gen L es el gen más extenso con 6,700 pb de las aproximadamente 15,456 bases que el virus posee; a diferencia del resto de los genes que varía entre 1,055 y 1,800 pb.

Posteriormente se identificó la rama a la cual se le atribuye la incongruencia, comparando la topología del árbol de cada gen entre sí, los árboles se realizaron con 2 diferentes “*outgroups*”, el primero con el CPIV-3 y el segundo con secuencias del HPIV-3 (EU424062.1, AB12132.1, FJ455842.2, KF687346.1, KF530245.1) con la finalidad de descartar cambios en la topología debido a la secuencia *outgroup*. Como resultado de dicha comparación, se encontró un cambio en la cepa Estadounidense Texas/1981 de origen porcino, ya que, en todos los genes, se encuentra dentro del subgenotipo A2 y en el gen L, esta cepa se encuentra dentro

del subgenotipo A1. Esta incongruencia en la topología del árbol del gen L es alusiva a un proceso de recombinación en dicho gen (**Figuras 18, 19 y 20**).

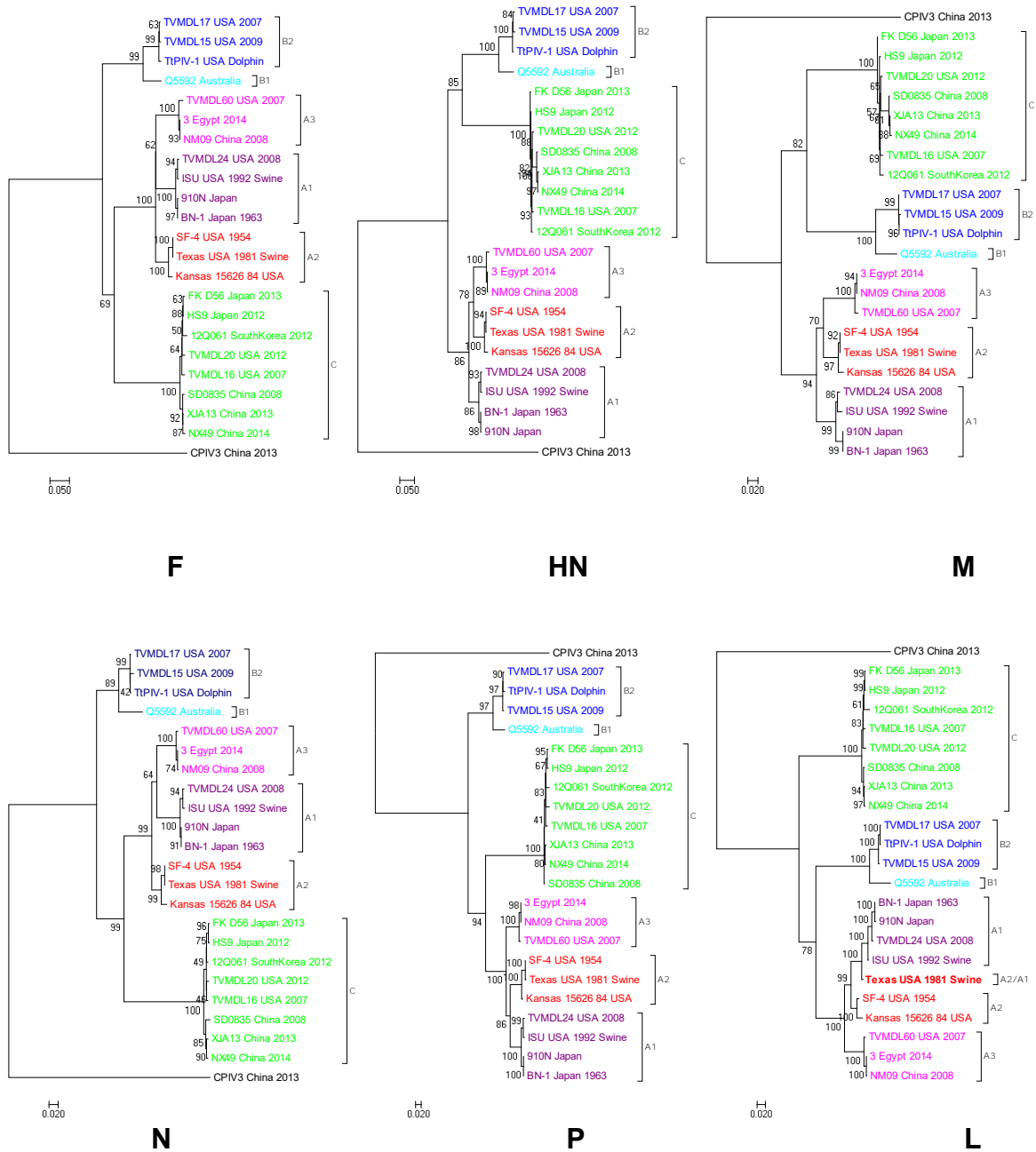


Figura 18. Comparación de los árboles generados en la prueba de topología. Se puede observar en el gen L el cambio de la cepa Texas/1981 del subgenotipo A2 (Rojo) al A1 (Púrpura). Los arboles fueron contruidos por el método de Máxima Verosimilitud. Se utilizaron como *outgroup* la cepa del CPIV-3.

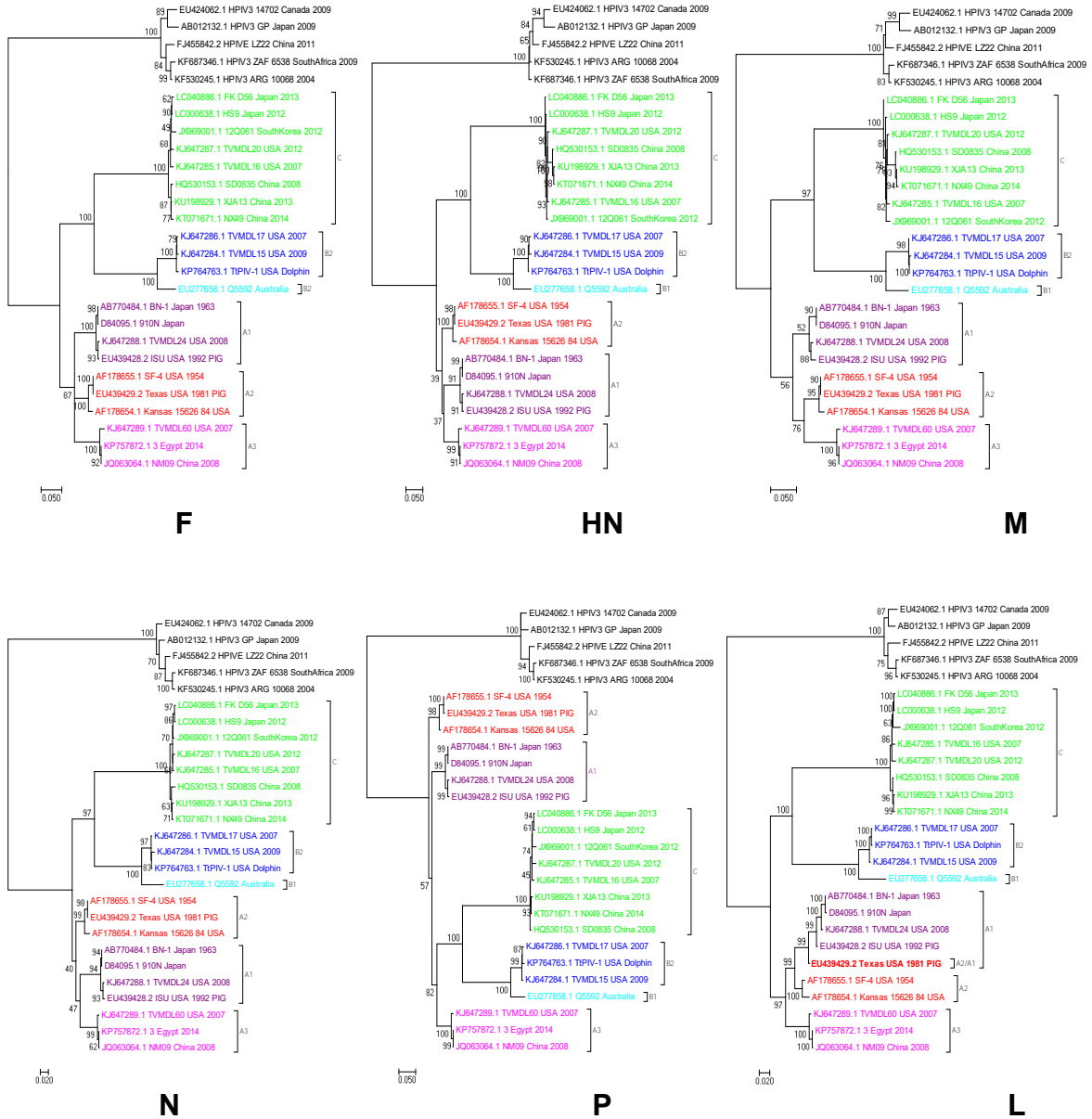


Figura 19. Comparación de los árboles generados en la prueba de topología. Se puede observar en el gen L el cambio de la cepa Texas/1981 del subgenotipo A2 (Rojo) al A1 (Púrpura). Los arboles fueron construidos por el método de Máxima Verosimilitud. Se utilizaron como *outgroup* las cepas del HPIV-3.

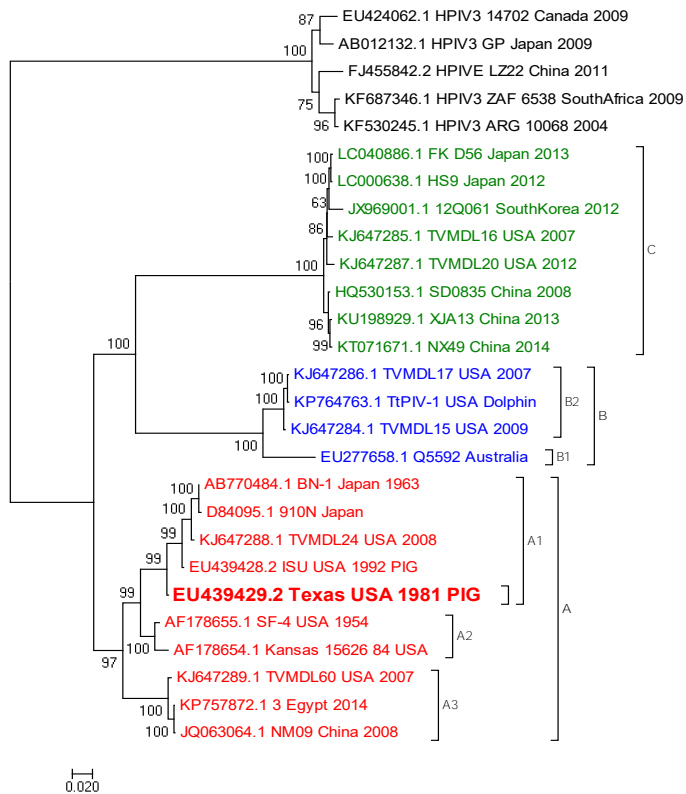
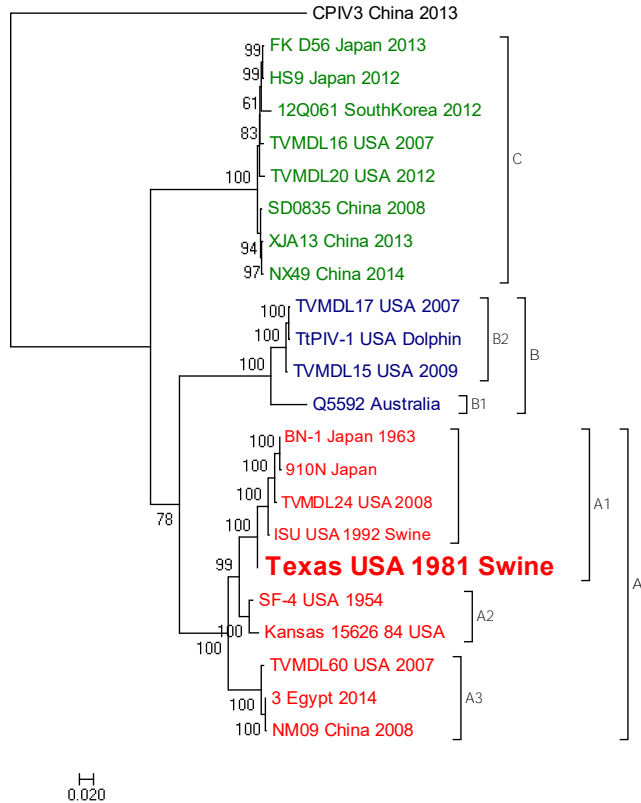


Figura 20. Árboles filogenéticos del gen L del BPIV-3 con diferentes *outgroups*, donde se muestra el cambio de la cepa Texas/1981 del subgenotipo A2 al A1, con respecto del resto de los genes.

6.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PROCESOS DE RECOMBINACIÓN

Utilizando siete pruebas para detectar procesos de recombinación del programa RDP4, se identificaron cinco posibles procesos de recombinación, de los cuales solo cuatro se tomaron como procesos potenciales de recombinación. Estos se encontraron en secuencias de origen estadounidense, dos provenientes de ganado bovino (cepas SF-4 y TVMDL24) y dos provenientes de ganado porcino (cepas Texas/1981 e ISU/1992). Donde las dos recombinantes son las de ganado porcino y como donantes de dicho material genético se encuentran las de ganado bovino (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados de las pruebas de detección de recombinación en RDP4.

	RECOMBINANTE	DONANTE PRINCIPAL	DONANTE MENOR	METODOS DE DETECCIÓN DE RECOMBINACIÓN						
				R	G	B	M	C	S	T
1	Texas/1981	SF-4	TVMDL24	+	+	+	+	+	+	+
2	Texas/1981	SF-4	TVMDL24	-	+	+	+	+	+	+
3	ISU/1992	TVMDL24	Texas/1981	+	+	+	+	+	+	+
4	ISU/1992	SF-4	TVMDL24	-	+	+	+	+	+	+

RDP (R), GENECONV (G), Bootscan (B), MaxChin (M), Chimaera (C), SiScan (S) y 3Seq (T).

En la primera recombinante, Texas/1981, se detectó que más de la mitad de la secuencia tiene como donante genético a la cepa TVMDL24, es por eso que en el árbol filogenético del gen L, la cepa Texas/1981 pasa a formar parte del subgenotipo A1, al cual pertenece la cepa donante TVMDL24. Además, existe otro proceso de recombinación, donde la cepa ISU/1992 recibió material genético tanto de la cepa Texas/1981, como de la cepa TVMDL24, de esta última cepa de manera indirecta, por lo que también forma parte de la justificación del cambio de subgenotipo por parte de la cepa Texas/1981. En la cepa Texas/1981 la recombinación se dio de las bases 1 a 3,943 y de la 4,925 a 5,478, ambas por parte de la cepa TVMDL24; y en

la cepa ISU/1992 la recombinación se dio de las bases 4,907 a 6,290 por parte de la cepa Texas/1981 y de la 4,907 a la 5,460 por parte de la cepa TVMDL24 (Figura 21).



Figura 21. Secuencias recombinantes y sus donantes. En la cepa Texas/1981 la recombinación se dio de las bases 1 a 3,943 y de la 4,925 a 5,478, ambas por parte de la cepa TVMDL24; y en la cepa ISU/1992 la recombinación se dio de las bases 4,907 a 6,290 por parte de la cepa Texas/1981 y de la 4,907 a la 5,460 por parte de la cepa TVMDL24.

7. DISCUSIÓN

El BPIV-3 es uno de los principales virus que forman parte del CRB, enfermedad multifactorial que representa una de las principales causas de muerte en las explotaciones bovinas y ocasiona grandes pérdidas económicas a nivel mundial (Gershwin *et al.*, 2015). A pesar de los esfuerzos que se han hecho por erradicar a los patógenos de dicho complejo, aún faltan muchos estudios que ofrezcan las herramientas necesarias para poder lograrlo. Conocer los mecanismos evolutivos de cada patógeno, es fundamental para comprender la epidemiología de estos microorganismos; elucidar los mecanismos de virulencia y patogenicidad, comprender los mecanismos de transmisión y tener un mejor entendimiento de la susceptibilidad del patógeno puede brindar herramientas suficientes para desarrollar mejores técnicas de diagnóstico, mejores tratamientos y vacunas más eficientes (Yang *et al.*, 2008; Sintchenko y Holmes, 2015).

En este trabajo, se analizaron 22 SGC del BPIV-3 para precisar los genotipos y subgenotipos del virus, se estableció la distribución de los genotipos presentes a nivel mundial a partir de 250 secuencias reportadas y se determinó, mediante un TT, que la recombinación forma parte de los mecanismos evolutivos del virus. Con base en los análisis filogenéticos realizados a las SGC, se determinaron 3 genotipos: BPIV3-A, BPIV3-B y BPIV3-C. El genotipo A había sido descrito previamente en distintos estudios (Horwood *et al.*, 2008; Vaucher *et al.*, 2011; Maidana *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2012; Ohkura *et al.*, 2013; Neill *et al.*, 2015; Sobhy *et al.*, 2017), pero solo en 2 de ellos se había sugerido la división en 3 subgenotipos basados en el grado de divergencia de las secuencias (Neill *et al.*, 2015; Sobhy *et*

al., 2017). El genotipo B ha sido descrito de igual forma (Horwood *et al.*, 2008; Maidana *et al.*, 2012; Neill *et al.*, 2015; Fulton *et al.*, 2016). Neill y col., propusieron que este genotipo también podría formar tres subgrupos, donde las cepas aisladas en Estados Unidos constituyesen el primer subgenotipo, las australianas el segundo y las cepas argentinas de búfalos el tercero. No obstante, en este trabajo se determinaron únicamente 2 subgenotipos, conformados por las cepas australianas (B1) y las cepas estadounidenses (B1 y B2). Finalmente, el genotipo C que también había sido descrito anteriormente por múltiples autores (Zhu *et al.*, 2011; Maidana *et al.*, 2012; Oem *et al.*, 2013; Konishi *et al.*, 2014; Neill *et al.*, 2015), no tuvo ninguna subdivisión y se sigue considerando como el más homogéneo de los genotipos. Al realizar los análisis filogenéticos para cada gen, se halló en los genes HN, M, N y P un subgenotipo hipotético de BPIV3-A, que se propone como el subgenotipo A4, lo que deberá confirmarse con la secuenciación del genoma completo y análisis filogenético de dichos aislados japoneses, pertenecientes a la región de Akkeshi.

Con los análisis filogenéticos por gen, y utilizando 250 secuencias reportadas disponibles, se determinó la distribución de los genotipos y subgenotipos a nivel mundial, concluyendo que el BPIV3-A es un genotipo presente en Australia (A1), Brasil (A2), Canadá (A1), China (A3), Egipto (A3), Estados Unidos (A1, A2 y A3), Irán, (A3), Japón (A1 y “A4”) y Reino Unido (A1). El BPIV3-B está presente en Australia (B1) y en Estados Unidos (B1 y B2). Y finalmente, el BPIV3-C se encuentra presente en China, Corea del Sur, Japón, Estados Unidos, Reino Unido, Serbia y Turquía. La cepa canadiense, las cepas iraníes, algunas cepas japonesas y las cepas serbias y turcas no habían sido categorizadas por genotipo y subgenotipo

previamente a este trabajo. Además, es el primer trabajo que divide todas las cepas actualmente reportadas en subgenotipos. No se pudo determinar la presencia de linajes o clados acordes a la distribución geográfica de los genotipos y subgenotipos basados en las secuencias hasta ahora reportadas.

En cuanto a las cepas argentinas, no se pudo confirmar que correspondan con el BPIV-3. Al generar el análisis filogenético de las secuencias disponibles para el gen M, se pudo detectar una irregularidad en el alineamiento y en el análisis filogenético reportado en estas secuencias (Maidana *et al.*, 2012). Dicho estudio argumenta que las secuencias se encuentran distribuidas a lo largo de los tres genotipos del virus, pero al analizar las mismas secuencias en este estudio, estas se encontraron muy alejadas genéticamente del BPIV-3 e incluso de los miembros del género *Respirovirus*. Utilizando BLAST, se determinó que las secuencias argentinas tienen una identidad de nucleótidos menor al 75% con cepas del HPIV y del BPIV-3, por lo que no se puede confirmar la familia o género al que pertenecen. Esto puede deberse a un error en los análisis filogenéticos realizados en el estudio argentino o a una falla al momento de ingresar las secuencias a la base de datos del GenBank.

Llevando a cabo la caracterización, se evidenció la recombinación como proceso evolutivo del BPIV-3. Por medio de un TT generado en IQ-TREE y utilizando el programa RDP4 se detectaron cuatro potenciales eventos de recombinación que comprenden 2 cepas recombinantes (Texas/1981 e ISU/1992), ambas de origen porcino (Qiao *et al.*, 2009, 2010); donde Texas/1981 pertenece al subgenotipo A2 e ISU/1992 al subgenotipo A1. En los dos eventos de recombinación de la cepa Texas/1981, tiene como donante principal a la cepa SF-4 perteneciente al genotipo

A1 y como donante menor la cepa TVMDL24 que concierne en el subgenotipo A1. En cuanto a la cepa ISU/1992, tiene como donante principal en el primer evento a la cepa TVMDL24 y como donante menor a la cepa Texas/1981; y en el segundo evento como donante principal a la cepa SF-4 y como donante menor a la cepa TVMDL24. En Texas/1981 se detectó que más de la mitad de la secuencia tiene como donante genético a la cepa TVMDL24, ya que en el árbol filogenético del gen L procedente del TT, la cepa Texas/1981 pasa a formar parte del subgenotipo A1, al cual pertenece la cepa donante TVMDL24, por lo que se descarta que el material genético que detecta el programa como recombinación sea de la donante principal SF-4. En este caso la recombinación se dio de la primera base a la 3,943 (3,943 bases) y de la 4,925 a 5,478 (553 bases), ambos eventos tienen como donante a la cepa TVMDL24.

Además, existe otro proceso de recombinación, donde la cepa ISU/1992 recibió material genético tanto de la cepa Texas/1981 y en menor medida y de manera indirecta de la cepa TVMDL24, por lo que también justifica el cambio de subgenotipo por parte de la cepa Texas/1981, donde se encuentra más cercano de las cepas TVMDL24 e ISU/1992 debido a que comparten parte de su secuencia. En este caso, la recombinación se dio de las bases 4,907 a 6,290 (1,383 bases) por parte de la cepa Texas/1981 y de la 4,907 a la 5,460 (553 bases) por parte de la cepa TVMDL24; lo que sugiere que la recombinación se presentó posteriormente al primer evento de recombinación, considerando que dentro de las 1,383 bases de la cepa donante Texas/1981 ya se encuentran presentes las 553 bases que donó la cepa TVMDL24 a la cepa Texas/1981 en el primer evento de recombinación.

La recombinación es un evento que se presenta en tasas muy bajas en virus ARN de sentido negativo (Han y Worobey, 2011). Sin embargo, existen muchos estudios que reportan este evento en diferentes familias de dichos virus y muchos de esos reportes en virus de la familia *Paramyxoviridae*. Existen reportes de recombinación en el Virus Sincitial Respiratorio (RSV), *Pneumovirus* en el que emplearon coinfecciones experimentales y marcadores genéticos para demostrar este proceso (Spann *et al.*, 2003). También podemos encontrar reportes en el virus de Paperas (*Rubulavirus*) y en el virus de Newcastle (NDV) (*Avulavirus*); donde buscaron incongruencias filogenéticas para demostrar que pueden existir procesos de recombinación, aunque en tasas muy bajas en virus ARN de sentido negativo (Chare *et al.*, 2003). En el caso del NDV, existen diversos estudios que reportan la recombinación como parte de proceso evolutivo del virus (Han *et al.*, 2008a; Chong *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Satharasinghe *et al.*, 2016). Igualmente, se han encontrado procesos de recombinación en *Morbilivirus*; un estudio proporcionó evidencia de que la recombinación puede ocurrir en el virus del sarampión y que ha tenido un impacto detectable en la evolución del virus (Schierup *et al.*, 2005). Dentro de este género, también se han encontrado eventos de recombinación en el virus de Distemper Canino (CDV) a lo largo de su genoma (McCarthy *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008b; Yuan *et al.*, 2017). Finalmente, dentro del mismo género de los *Respirovirus*, se ha justificado la presencia de recombinación en el HPIV-3 (Yang *et al.*, 2011). Además, en el mismo trabajo, se había sugerido que tal vez existiese un proceso de recombinación en las cepas porcinas del BPIV-3; pero no se había caracterizado, por lo que este es el primer trabajo donde se demuestra que la recombinación juega un papel importante en la evolución y transmisión del BPIV-3,

al igual que en el caso del HPIV-3. Cabe mencionar, que la recombinación dentro del gen L ya ha sido sugerida en el virus de la Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo y reportada en el NDV y en el CDV (Lukashev, 2005; Zhang *et al.*, 2010; Satharasinghe *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2017).

La recombinación es el intercambio de material genético entre dos virus que coinfectan una misma célula y este proceso ha sido asociado con el aumento en el rango de huéspedes por parte de los virus, aumento en la virulencia, dando forma a la diversidad viral purgando las mutaciones perjudiciales y favoreciendo la acumulación de mutaciones beneficiosas, en la evasión de la respuesta inmune y en la evolución de la resistencia a los antivirales (Simon-Loriere y Holmes, 2011; Xiao *et al.*, 2016; Poirier y Vignuzzi, 2017). El proceso de recombinación detectado entre cepas de origen porcino y cepas de origen bovino evidencian la capacidad de adaptación del BPIV-3 a células de diferentes especies, demostrando que la transmisión entre especies es de vital importancia para la evolución de este virus. Se sabe que el dominio de unión al receptor de la proteína HN se puede adaptar a análogos de ácido siálico en distintos hospederos, lo que facilita el cambio de tropismo celular haciendo que surjan nuevos hospederos y puede explicar la convergencia de las cepas involucradas en los eventos de recombinación en una misma célula (Bowden *et al.*, 2010).

Dependiendo del origen de las cadenas parentales, la recombinación se divide en: intragenómica, en la que las cadenas recombinantes pertenecen a la misma unidad genética y la recombinación intergenómica, en la que los fragmentos tienen diferentes orígenes. La recombinación intragenómica está relacionada con la

regulación de la expresión génica y la recombinación intergenómica representa una estrategia para generar diversidad genética y para mantener la integridad cromosómica; es la forma más común en virus ARN, ya que es capaz de generar nuevas variantes con diferentes características biológicas. Tal es el caso de los eventos de recombinación detectados en este trabajo, por lo que se justifica una vez más la recombinación como proceso evolutivo que facilita la adaptación a diferentes hospederos por parte del BPIV-3 (Perez-Losada *et al.*, 2015).

Diversos factores genéticos y epidemiológicos pueden afectar la probabilidad de recombinación entre diferentes cepas, incluidos la homología genética, el tamaño de la población en el hospedador, la co-circulación en la misma área geográfica, la prevalencia en la población y la tasa de coinfección (Perez-Losada *et al.*, 2015). Debido a estos factores y para profundizar en los mecanismos evolutivos y en la epidemiología molecular del virus, se requieren más estudios a nivel mundial donde se colecten, aislen, secuencien y caractericen diferentes cepas del BPIV-3 que nos permitan detectar más eventos de recombinación, determinar la tasa de recombinación, las tasas de coinfección y las tasas de mutación, hacer análisis filogeográficos de los genotipos, subgenotipos del virus; con el objetivo de mejorar las técnicas de diagnóstico, plantear vacunas más eficientes conjuntamente con nuevos y mejores tratamientos, así como mejores mecanismos de bioseguridad a nivel de campo, ya que como se ha visto la adaptación a diferentes hospederos es uno de los principales mecanismos evolutivos del BPIV-3.

8. CONCLUSIONES

- I. Se confirmaron los tres genotipos del virus, así como los tres subgenotipos del BPIV3-A y los dos subgenotipos dentro del BPIV3-B, utilizando todas las SGC disponibles en GenBank.
- II. Se propone un cuarto subgenotipo dentro del BPIV3-A (A4) que se encontró en los genes HN, M, N y P.
- III. Se encontró que las secuencias del virus reportadas en Argentina (Maidana *et al.*, 2012), tanto en búfalos como en ganado bovino no pertenecen al genotipo B, como la publicación lo sugiere.
- IV. No se pudo determinar la filogeografía, el ancestro común ni la tasa de mutación para el virus por *molecular clock* debido a la falta de secuencias completas, así como por la similitud de los aislados.
- V. Se detectaron eventos de recombinación, como mecanismo evolutivo, dentro del gen L, los cuales fueron confirmados por un test de topología, así como por métodos logarítmicos que detectan dicho mecanismo evolutivo.

9. PROSPECTIVA

- 1) Establecer el estatus zoonosario del virus en poblaciones ganaderas de México y determinar los genotipos y subgenotipos caracterizando las variantes genéticas que circulan en el país.
- 2) Determinar si existen diferencias antigénicas entre los genotipos y subgenotipos identificados.

REFERENCIAS

- Ackermann MR, Derscheid R, Roth JA. 2010. Innate immunology of bovine respiratory disease. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice* 26:215-228.
- Alymova IV, Taylor G, Mishin VP, Watanabe M, Murti KG, Boyd K, Chand P, Babu YS, Portner A. 2008. Loss of the N-linked glycan at residue 173 of human parainfluenza virus type 1 hemagglutinin-neuraminidase exposes a second receptor-binding site. *Journal of virology* 82:8400-8410.
- Arede M, Nielsen PK, Ahmed SS, Halasa T, Nielsen LR, Toft N. 2016. A space-time analysis of *Mycoplasma bovis*: bulk tank milk antibody screening results from all Danish dairy herds in 2013-2014. *Acta veterinaria Scandinavica* 58:16.
- Audsley MD, Moseley GW. 2013. Paramyxovirus evasion of innate immunity: Diverse strategies for common targets. *World journal of virology* 2:57-70.
- Barba M, Czosnek H, Hadidi A. 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* 6:106-136.
- Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palu G. 2011. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *International journal of molecular sciences* 12:7861-7884.
- Belshaw R, Pybus OG, Rambaut A. 2007. The evolution of genome compression and genomic novelty in RNA viruses. *Genome research* 17:1496-1504.
- Boni MF, Posada D, Feldman MW. 2007. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176:1035-1047.
- Bowden TA, Crispin M, Jones EY, Stuart DI. 2010. Shared paramyxoviral glycoprotein architecture is adapted for diverse attachment strategies. *Biochemical Society transactions* 38:1349-1355.
- Carbonero A, Maldonado A, Perea A, García-Bocanegra I, Borge C, Torralbo A, Arenas-Montes A, Arenas-Casas A. 2011. Risk factors against bovine respiratory disease in suckling calves from argentina. *Arch Zootec* 60:41-51.
- Cernicchiaro N, Renter DG, White BJ, Babcock AH, Fox JT. 2012. Associations between weather conditions during the first 45 days after feedlot arrival and daily respiratory disease risks in autumn-placed feeder cattle in the United States. *Journal of animal science* 90:1328-1337.
- Cox R, Plemper RK. 2015. The paramyxovirus polymerase complex as a target for next-generation anti-paramyxovirus therapeutics. *Frontiers in microbiology* 6:459.
- Cusack P, McMeniman N, I. L. 2003. The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J* 81:8.
- Cusack PM, McMeniman NP, Lean IJ. 2007. Feedlot entry characteristics and climate: their relationship with cattle growth rate, bovine respiratory disease and mortality. *Australian veterinary journal* 85:311-316.
- Chakraborty S, Kumar A, Tiwari R, Rahal A, Malik Y, Dhama K, Pal A, Prasad M. 2014. Advances in diagnosis of respiratory diseases of small ruminants. *Veterinary medicine international* 2014:508304.
- Chang A, Dutch RE. 2012. Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end. *Viruses* 4:613-636.
- Chare ER, Gould EA, Holmes EC. 2003. Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses. *The Journal of general virology* 84:2691-2703.
- Chirase NK, Greene LW, Purdy CW, Loan RW, Auvermann BW, Parker DB, Walborg Jr EF, Stevenson DE, Xu Y, Klaunig JE. 2004. Effect of transport stress on respiratory disease, serum

- antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *Am J Vet Res* 65:4.
- Chong YL, Padhi A, Hudson PJ, Poss M. 2010. The effect of vaccination on the evolution and population dynamics of avian paramyxovirus-1. *PLoS pathogens* 6:e1000872.
- De la Rosa-Romero JL, Martínez-Maya JJ, Hernández-Castro R, Trigo-Tavera FJ, Jaramillo-Arango CJ, Aguilar-Romero F, Suárez-Güemes F. 2012. Frequency of Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida isolates obtained from calves with clinical signs of respiratory tract disease from a dairy complex in the state of Hidalgo, México. *Vét Méx* 43:1-8.
- DeRosa DC, Mechor GD, Staats JJ, Chengappa MM, Shryock TR. 2000. Comparison of Pasteurella spp. Simultaneously Isolated from Nasal and Transtracheal Swabs from Cattle with Clinical Signs of Bovine Respiratory Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 38:327-332.
- Domingo E, Sheldon J, Perales C. 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 76:159-216.
- Dong XM, Zhu YM, Cai H, Lv C, Gao YR, Yu Z, Xue F. 2012. Studies on the pathogenesis of a Chinese strain of bovine parainfluenza virus type 3 infection in Balb/c mice. *Veterinary microbiology* 158:199-204.
- Earley B, Murray M, Prendiville DJ. 2010. Effect of road transport for up to 24 hours followed by twenty-four hour recovery on live weight and physiological responses of bulls *BMC veterinary research* 6:13.
- Ellis JA. 2010. Bovine parainfluenza-3 virus. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice* 26:575-593.
- Figuroa-Chavez D, Segura-Correa JC, Garcia-Marquez LJ, Pescador-Rubio A, Valdivia-Flores AG. 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. *Tropical animal health and production* 44:1417-1421.
- Fu YX, Li WH. 1993. Maximum Likelihood Estimation of Population Parameters. *Genetics* 134:1261-1270.
- Fulton RW, d'Offay JM, Landis C, Miles DG, Smith RA, Saliki JT, Ridpath JF, Confer AW, Neill JD, Eberle R, Clement TJ, Chase CC, Burge LJ, Payton ME. 2016. Detection and characterization of viruses as field and vaccine strains in feedlot cattle with bovine respiratory disease. *Vaccine* 34:3478-3492.
- Gagea M, Bateman K, Dreumel T, McEwen B, Carman S, Archambault M, Shanahan R, Caswel J. 2006. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *Journal of veterinary diagnostic investigation* : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 18:11.
- Gershwin LJ, Van Eenennaam AL, Anderson ML, McEligot HA, Shao MX, Toaff-Rosenstein R, Taylor JF, Neiberghs HL, Womack J, Bovine Respiratory Disease Complex Coordinated Agricultural Project Research T. 2015. Single Pathogen Challenge with Agents of the Bovine Respiratory Disease Complex. *PloS one* 10:e0142479.
- Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. 2000. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16:573-582.
- Goris K, Uhlenbruck S, Schwegmann-Wessels C, Kohl W, Niedorf F, Stern M, Hewicker-Trautwein M, Bals R, Taylor G, Braun A, Bicker G, Kietzmann M, Herrler G. 2009. Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection. *Journal of virology* 83:1962-1968.
- Grissett GP, White BJ, Larson RL. 2015. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 29:770-780.

- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology* 52:696-704.
- Hagglund S, Svensson C, Emanuelson U, Valarcher JF, Alenius S. 2006. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. *Veterinary journal* 172:320-328.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41:95-98.
- Han GZ, He CQ, Ding NZ, Ma LY. 2008a. Identification of a natural multi-recombinant of Newcastle disease virus. *Virology* 371:54-60.
- Han GZ, Liu XP, Li SS. 2008b. Cross-species recombination in the haemagglutinin gene of canine distemper virus. *Virus research* 136:198-201.
- Han GZ, Worobey M. 2011. Homologous recombination in negative sense RNA viruses. *Viruses* 3:1358-1373.
- Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP. 2010. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42:1416-1429.
- Härtel H, Nikunen S, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivelä S-L, Aho P, Soveri T, Saloniemi H. 2004. Viral and Bacterial Pathogens in Bovine Respiratory Disease in Finland. *Acta vet scand* 45:8.
- Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Le SV. 2017. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular biology and evolution*.
- Horwood PF, Gravel JL, Mahony TJ. 2008. Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes. *The Journal of general virology* 89:1643-1648.
- Juárez-Barranco F, Trigo-Tavera FJ, Chávez-Gris G, Vargas-García RE. 2003. Viral participation in respiratory disease in feedlot cattle, as identified by immunohistochemistry. *Vet Méx* 34:1-12.
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermini LS. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14:587.
- Kimura M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci* 78,(1) 454-458.
- Kirchhoff J, Uhlenbruck S, Goris K, Keil GM, Herrler G. 2014a. Three viruses of the bovine respiratory disease complex apply different strategies to initiate infection. *Veterinary research* 45:20.
- Kirchhoff J, Uhlenbruck S, Keil GM, Schwegmann-Wessels C, Ganter M, Herrler G. 2014b. Infection of differentiated airway epithelial cells from caprine lungs by viruses of the bovine respiratory disease complex. *Veterinary microbiology* 170:58-64.
- Kishino H, Hasegawa M. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *Journal of Molecular Evolution* 29:170-179.
- Komatsu T, Takeuchi K, Gotoh B. 2007. Bovine parainfluenza virus type 3 accessory proteins that suppress beta interferon production. *Microbes Infect* 9:954-962.
- Konishi M, Ohkura T, Shimizu M, Akiyama M, Kameyama K, Takeuchi K. 2014. Complete genome sequence of the first isolate of genotype C bovine parainfluenza virus type 3 in Japan. *Genome announcements* 2.
- Koonin EV, Dolja VV. 2014. Virus world as an evolutionary network of viruses and capsidless selfish elements. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 78:278-303.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution* 33:1870-1874.

- Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS. 2006. Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 344:30-37.
- Lawrence MC, Borg NA, Streltsov VA, Pilling PA, Epa VC, Varghese JN, McKimm-Breschkin JL, Colman PM. 2004. Structure of the Haemagglutinin-neuraminidase from Human Parainfluenza Virus Type III. *Journal of molecular biology* 335:1343-1357.
- Lima SF, Teixeira AG, Higgins CH, Lima FS, Bicalho RC. 2016. The upper respiratory tract microbiome and its potential role in bovine respiratory disease and otitis media. *Scientific reports* 6:29050.
- Love WJ, Lehenbauer TW, Kass PH, Van Eenennaam AL, Aly SS. 2014. Development of a novel clinical scoring system for on-farm diagnosis of bovine respiratory disease in pre-weaned dairy calves. *PeerJ* 2:e238.
- Lukashev AN. 2005. Evidence for recombination in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *The Journal of general virology* 86:2333-2338.
- Mahan SM, Sobecki B, Johnson J, Oien NL, Verhelle S, Mattern SJ, Bowersock TL, Leyh RD. 2016. Efficacy of intranasal vaccination with a multivalent vaccine containing temperature-sensitive modified-live bovine herpesvirus type 1 for protection of seronegative and seropositive calves against respiratory disease. *JAVMA* 248:1280-1286.
- Maidana SS, Lomonaco PM, Combessies G, Craig MI, Diodati J, Rodriguez D, Parreno V, Zabal O, Konrad JL, Crudelli G, Mauroy A, Thiry E, Romera SA. 2012. Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC veterinary research* 8:83.
- Mansoor F, Earley B, Cassidy JP, Markey B, Doherty S, Welsh MD. 2015. Comparing the immune response to a novel intranasal nanoparticle PLGA vaccine and a commercial BPI3V vaccine in dairy calves. *BMC veterinary research* 11:220.
- Mansoor F, Earley B, Cassidy JP, Markey B, Foster C, Doherty S, Welsh MD. 2014. Intranasal delivery of nanoparticles encapsulating BPI3V proteins induces an early humoral immune response in mice. *Research in veterinary science* 96:551-557.
- Martin D, Rybicki E. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16:562-563.
- Martin DP, Posada D, Crandall KA, Williamson C. 2005. A Modified Bootscan Algorithm for Automated Identification of Recombinant Sequences and Recombination Breakpoints. *AIDS Research and Human Retroviruses* 21:5.
- Maynard Smith J. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 34: 126-129.
- McCarthy AJ, Shaw MA, Goodman SJ. 2007. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proceedings Biological sciences* 274:3165-3174.
- Minh BQ, Nguyen MA, von Haeseler A. 2013. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular biology and evolution* 30:1188-1195.
- Mishin VP, Watanabe M, Taylor G, Devincenzo J, Bose M, Portner A, Alymova IV. 2010. N-linked glycan at residue 523 of human parainfluenza virus type 3 hemagglutinin-neuraminidase masks a second receptor-binding site. *Journal of virology* 84:3094-3100.
- Moore SJ, O'Dea MA, Perkins N, O'Hara AJ. 2015. Estimation of nasal shedding and seroprevalence of organisms known to be associated with bovine respiratory disease in Australian live export cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 27:6-17.
- Moscona A. 2005. Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. *The Journal of clinical investigation* 115:1688-1698.

- Neiberghs JS, Neiberghs HL, Taylor JF, Seabury CM, Lehenbauer TW, Van Eenennaam AL, Womack JE. 2014. An Estimate of the Economic Gain from Selection to Reduce BRDC Incidence in Dairy Calves. Proceedings, 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.
- Neill JD, Ridpath JF, Valayudhan BT. 2015. Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States. *BMC veterinary research* 11:112.
- Ng TF, Kondov NO, Deng X, Van Eenennaam A, Neiberghs HL, Delwart E. 2015. A metagenomics and case-control study to identify viruses associated with bovine respiratory disease. *Journal of virology* 89:5340-5349.
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution* 32:268-274.
- O'Neill R, Mooney J, Connaghan E, Furphy C, Graham DA. 2014. Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: a retrospective study. *The Veterinary record* 175:351.
- Oem JK, Lee EY, Lee KK, Kim SH, Lee MH, Hyun BH. 2013. Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate. *Veterinary microbiology* 162:224-227.
- Ohkura T, Kokuho T, Konishi M, Kameyama K, Takeuchi K. 2013. Complete Genome Sequences of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 Strain BN-1 and Vaccine Strain BN-CE. *Genome announcements* 1.
- Ohkura T, Minakuchi M, Sagai M, Kokuho T, Konishi M, Kameyama K, Takeuchi K. 2015. Infection of the upper respiratory tract of hamsters by the bovine parainfluenza virus type 3 BN-1 strain expressing enhanced green fluorescent protein. *Virology* 476:134-140.
- Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM. 1999. Possible Emergence of New Geminiviruses by Frequent Recombination. *Virology* 265:8.
- Perez-Losada M, Arenas M, Galan JC, Palero F, Gonzalez-Candelas F. 2015. Recombination in viruses: mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 30:296-307.
- Poirier EZ, Vignuzzi M. 2017. Virus population dynamics during infection. *Current opinion in virology* 23:82-87.
- Posada D, Crandall KA. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:13757-13762.
- Presloid JB, Novella IS. 2015. RNA Viruses and RNAi: Quasispecies Implications for Viral Escape. *Viruses* 7:3226-3240.
- Qiao D, Janke BH, Elankumaran S. 2009. Molecular characterization of glycoprotein genes and phylogenetic analysis of two swine paramyxoviruses isolated from United States. *Virus genes* 39:53-65.
- Qiao D, Janke BH, Elankumaran S. 2010. Complete genome sequence and pathogenicity of two swine parainfluenzavirus 3 isolates from pigs in the United States. *Journal of virology* 84:686-694.
- Rai AN, Epperson WB, Nanduri B. 2015. Application of Functional Genomics for Bovine Respiratory Disease Diagnostics. *Bioinformatics and biology insights* 9:13-23.
- Ren JL, Zhu YM, Zhou YH, Lv C, Yan H, Ma L, Shi HF, Xue F. 2015. Identification of three antigen epitopes on the nucleocapsid protein of the genotype C of bovine parainfluenza virus type 3. *Veterinary microbiology* 178:61-69.

- Rodríguez-Santiago B, Armengol L. 2012. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenatal* 23:56-66.
- Rodriguez F, Oliver JI, Fau - Marin A, Marin A, Fau - Medina JR, Medina JR. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol* Feb 22;142(4):485-501.
- Roshtkhari F, Mohammadi G, Mayameei A. 2012. Serological evaluation of relationship between viral pathogens (BHV-1, BVDV, BRSV, PI-3V, and Adeno3) and dairy calf pneumonia by indirect ELISA. *Tropical animal health and production* 44:1105-1110.
- Sackhaee EA, Khalili M, Kazaminia S. 2009. Serological study of bovine viral respiratory diseases in dairy herds in Kerman province, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* 10:5.
- Salt JS, Thevasagayam SJ, Wiseman A, Peters AR. 2007. Efficacy of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV and BRSV in experimentally infected calves. *Veterinary journal* 174:616-626.
- Sanderson MW, Dargatz DA, Wagner BA. 2008. Risk factors for initial respiratory disease in United States feedlots based on producer-collected daily morbidity counts. *Can Vet J* 49:6.
- Sarmiento-Silva RE, Nakamura-Lopez Y, Vaughan G. 2012. Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine respiratory syncytial virus. *Viruses* 4:3452-3467.
- Satharasinghe DA, Murulitharan K, Tan SW, Yeap SK, Munir M, Ideris A, Omar AR. 2016. Detection of Inter-Lineage Natural Recombination in Avian Paramyxovirus Serotype 1 Using Simplified Deep Sequencing Platform. *Frontiers in microbiology* 7:1907.
- Schierup MH, Mordhorst CH, Muller CP, Christensen LS. 2005. Evidence of recombination among early-vaccination era measles virus strains. *BMC evolutionary biology* 5:52.
- Schmidt AC, Schaap-Nutt A, Bartlett EJ, Schomacker H, Boonyaratankornkit J, Karron RA, Collins PL. 2011. Progress in the development of human parainfluenza virus vaccines. *Expert review of respiratory medicine* 5:515-526.
- Schneider MJ, Tait RG, Jr., Busby WD, Reecy JM. 2009. An evaluation of bovine respiratory disease complex in feedlot cattle: Impact on performance and carcass traits using treatment records and lung lesion scores. *Journal of animal science* 87:1821-1827.
- Segura-Correa JC, Zapata-Campos CC, Jasso-Obregon JO, Martinez-Burnes J, Lopez-Zavala R. 2016. Seroprevalence and risk factors associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in North-Eastern Mexico. *Open veterinary journal* 6:143-149.
- Senchi K, Matsunaga S, Hasegawa H, Kimura H, Ryo A. 2013. Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenza virus type 3. *Frontiers in microbiology* 4:346.
- Shimodaira H. 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Systematic biology* 51:492-508.
- Shimodaira H, Hasegawa M. 1999. Multiple Comparisons of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference. *Molecular biology and evolution* 16:1114-1114.
- Shirvani E, Lotfi M, Kamalzadeh M, Noaman V, Bahriari M, Morovati H, Hatami A. 2012. Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses (BRSV, BoHV-1, PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province). *Tropical animal health and production* 44:191-195.
- Simon-Loriere E, Holmes EC. 2011. Why do RNA viruses recombine? *Nature reviews Microbiology* 9:617-626.
- Sintchenko V, Holmes EC. 2015. The role of pathogen genomics in assessing disease transmission. *Bmj* 350:h1314.
- Snowder GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL. 2005. Influence of breed, heterozygosity, and disease incidence on estimates of variance components of respiratory disease in preweaned beef calves. *J Anim Sci* 83:15.

- Snowder GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL. 2006. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. *Journal of animal science* 84:1999-2008.
- Sobhy NM, Mor SK, Bastawecy IM, Fakhry HM, Youssef CRB, Goyal SM. 2017. Surveillance, isolation and complete genome sequence of bovine parainfluenza virus type 3 in Egyptian cattle. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 5:8-13.
- Solis-Calderon JJ, Segura-Correa JC, Aguilar-Romero F, Segura-Correa VM. 2007. Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus-3 in beef cattle of Yucatan, Mexico. *Preventive veterinary medicine* 82:102-110.
- Spann KM, Collins PL, Teng MN. 2003. Genetic Recombination during Coinfection of Two Mutants of Human Respiratory Syncytial Virus. *Journal of virology* 77:11201-11211.
- Storz J, Lin X, Purdy CW, Chouljenko VN, Kousoulas KG, Enright FM, Gilmore WC, Briggs RE, Loan RW. 2000. Coronavirus and Pasteurella Infections in Bovine Shipping Fever Pneumonia and Evans' Criteria for Causation. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3291-3298.
- Streltsov VA, Pilling P, Barrett S, McKimm-Breschkin JL. 2015. Catalytic mechanism and novel receptor binding sites of human parainfluenza virus type 3 hemagglutinin-neuraminidase (hPIV3 HN). *Antiviral research* 123:216-223.
- Strimmer K, Rambaut A. 2002. Inferring confidence sets of possibly misspecified gene trees. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 269:137-142.
- Strimmer K, Von Haeseler A. 1997. Likelihood-mapping: A simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6815-6819.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution* 10:512-526.
- Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, Step DL, Confer AW. 2010a. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *Can Vet J* 51:1095-1102.
- Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, Step DL, Confer AW. 2010b. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for preventive measures? *Can Vet J* 51:1351-1359.
- Theurer ME, Larson RL, White BJ. 2015. Systematic review and meta-analysis of the effectiveness of commercially available vaccines against bovine herpesvirus, bovine viral diarrhea virus, bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza type 3 virus for mitigation of bovine respiratory disease complex in cattle. *JAVMA* 246:126-142.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:8.
- Thonur L, Maley M, Gilray J, Crook T, Laming E, Turnbull D, Nath M, Kim W. 2012. One-Step multiples real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovien parainfluenza virus 3. *BMC Vet Res* 8:9.
- Tuncer P, Yesilbag K. 2015. Serological detection of infection dynamics for respiratory viruses among dairy calves. *Veterinary microbiology* 180:180-185.
- Vaucher RA, Dezen D, Braga-Simonetti A, Rosado-Spilki F, Roehe PM. 2011. Phylogenetic characterization of bovine parainfluenza 3 from contaminated cell cultures and field isolates from brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:1440-1444.

- Wen YJ, Shi XC, Wang FX, Wang W, Zhang SQ, Li G, Song N, Chen LZ, Cheng SP, Wu H. 2012. Phylogenetic analysis of the bovine parainfluenza virus type 3 from cattle herds revealing the existence of a genotype A strain in China. *Virus genes* 45:542-547.
- Xiao S, Khattar SK, Subbiah M, Collins PL, Samal SK. 2012. Mutation of the f-protein cleavage site of avian paramyxovirus type 7 results in furin cleavage, fusion promotion, and increased replication in vitro but not increased replication, tissue tropism, or virulence in chickens. *Journal of virology* 86:3828-3838.
- Xiao Y, Rouzine IM, Bianco S, Acevedo A, Goldstein EF, Farkov M, Brodsky L, Andino R. 2016. RNA Recombination Enhances Adaptability and Is Required for Virus Spread and Virulence. *Cell host & microbe* 19:493-503.
- Yang HT, Jiang Q, Zhou X, Bai MQ, Si HL, Wang XJ, Lu Y, Zhao H, He HB, He CQ. 2011. Identification of a natural human serotype 3 parainfluenza virus. *Virology journal* 8:58.
- Yang X, Yang H, Zhou G, Zhao GP. 2008. Infectious disease in the genomic era. *Annual review of genomics and human genetics* 9:21-48.
- Yang Y, Wang FX, Sun N, Cao L, Zhang SQ, Zhu HW, Guo L, Cheng SP, Wen YJ. 2015. Development and evaluation of two truncated recombinant NP antigen-based indirect ELISAs for detection of bovine parainfluenza virus type 3 antibodies in cattle. *Journal of virological methods* 222:47-54.
- Yavru S, Simsek A, Yapkic O, Kale M. 2005. Serological evaluation of viral infections in bovine respiratory tract. *Acta veterinaria* 55:219-226.
- Yener Z, Saglam YS, Timurkaan N, Ilhan F. 2005. Immunohistochemical Detection of Parainfluenza Type 3 Virus Antigens in Paraffin Sections of Pneumonic Caprine Lungs. *J Vet Med* 52:4.
- Yesilbag K, Alpay G, Becher P. 2017. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses* 9.
- Yeşilbağ K, Güngör B. 2007. Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. *Tropical animal health and production* 40:55-60.
- Yuan C, Liu W, Wang Y, Hou J, Zhang L, Wang G. 2017. Homologous recombination is a force in the evolution of canine distemper virus. *PloS one* 12:e0175416.
- Yuan P, Thompson TB, Wurzburg BA, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS. 2005. Structural studies of the parainfluenza virus 5 hemagglutinin-neuraminidase tetramer in complex with its receptor, sialyllactose. *Structure* 13:803-815.
- Zhang R, Wang X, Su J, Zhao J, Zhang G. 2010. Isolation and analysis of two naturally-occurring multi-recombination Newcastle disease viruses in China. *Virus research* 151:45-53.
- Zhu YM, Shi HF, Gao YR, Xin JQ, Liu NH, Xiang WH, Ren XG, Feng JK, Zhao LP, Xue F. 2011. Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China. *Veterinary microbiology* 149:446-451.

ANEXOS

ANEXO 1 (SECUENCIAS ANALIZADAS)

No. de acceso GenBank	Nombre de la Cepa	Tamaño secuencia	Fecha de colección	Hospedero	País	Gen
KC011285	1882	216	2009	Bovino	Argentina	M
KC011286	1885	216	2009	Bovino	Argentina	M
KC011287	10237	216	2009	Bovino	Argentina	M
KC011288	55275	216	2009	Bovino	Argentina	M
KC011289	100204	216	2011	Bovino	Argentina	M
KC011284	105189	216	2009	Bovino	Argentina	M
KC011282	2V	216	2009	Búfalo	Argentina	M
KC011283	7N	216	2009	Búfalo	Argentina	M
KC011281	7V	216	2009	Búfalo	Argentina	M
JQ627626	A2084	645	2009-2011	Bovino	UK	N
LC170486	Akan13	1662	2013	Bovino	Japón	HN
LC170479	Akan13	4985	2013	Bovino	Japón	M, N, P
LC170487	Akan14	1662	2014	Bovino	Japón	HN
LC170480	Akan14	4979	2014	Bovino	Japón	M, N, P
LC170488	Akkeshi12	1662	2012	Bovino	Japón	HN
LC170481	Akkeshi12	4967	2012	Bovino	Japón	M, N, P
LC170489	Akkeshi14	1662	2014	Bovino	Japón	HN
LC170482	Akkeshi14	4967	2014	Bovino	Japón	M, N, P
EF108222	BP4158	697	-N/A-	Desconocido	Australia	M
EF108223	BP4169	697	-N/A-	Desconocido	Australia	M
EF108224	BP6121	697	-N/A-	Desconocido	Australia	M
EF108225	BP6128	697	-N/A-	Desconocido	Australia	M
EU266069	BP7393	697	-N/A-	Desconocido	Australia	M
KF742396	BPI3 SRB001	375	2012	Bovino	Serbia	P
KF742397	BPI3 SRB002	372	2012	Bovino	Serbia	P
KF742398	BPI3 SRB003	369	2012	Bovino	Serbia	P
KF742399	BPI3 SRB004	333	2012	Bovino	Serbia	P
KF742400	BPI3 SRB005	372	2012	Bovino	Serbia	P
KF742401	BPI3 SRB006	372	2012	Bovino	Serbia	P
EF108221	BPI3(JCU)	697	-N/A-	Desconocido	Australia	M
KX579933	BPIV3-SRB001	577	03/13/2013	Bovino	Serbia	HN
KX579934	BPIV3-SRB002	577	03/22/2013	Bovino	Serbia	HN
KX579935	BPIV3-SRB003	577	03/13/2013	Bovino	Serbia	HN
KX579936	BPIV3-SRB004	577	03/22/2013	Bovino	Serbia	HN
KX579937	BPIV3-SRB005	577	05/03/2013	Bovino	Serbia	HN

KX579938	BPIV3-SRB006	577	05/03/2013	Bovino	Serbia	HN
KX579939	BPIV3-SRB062	577	04/18/2014	Bovino	Serbia	HN
KX579940	BPIV3-SRB100	577	04/18/2014	Bovino	Serbia	HN
DQ839608	DIO	989	2003	Bovino	Brasil	HN
LC170490	Hamanaka13-1	1662	abr-13	Bovino	Japón	HN
LC170483	Hamanaka13-1	4997	abr-13	Bovino	Japón	M, N, P
LC170491	Hamanaka13-2	1662	dic-13	Bovino	Japón	HN
LC170484	Hamanaka13-2	4991	dic-13	Bovino	Japón	M, N, P
LC170492	Kushiro13	1662	2013	Bovino	Japón	HN
LC170485	Kushiro13	4985	2013	Bovino	Japón	M, N, P
JQ627625	L3047	631	2009-2011	Bovino	UK	N
LC193729	M13	926	2002	Bovino	Irán	HN
LC193826	M13	312	2002	Bovino	Irán	M
LC193728	M8	926	2002	Bovino	Irán	HN
KU302387	OK309	1719	2012	Bovino	EUA	HN
KU302361	OK309	1623	2012	Bovino	EUA	F
KU302413	OK309	1548	2012	Bovino	EUA	N
KU255507	OKPR2	1719	2012	Bovino	EUA	HN
KU255493	OKPR2	1623	2012	Bovino	EUA	F
KU255521	OKPR2	1548	2012	Bovino	EUA	N
KR061998	QIA-B1201	1656	2012	Bovino	Corea del Sur	F
KR061999	QIA-B1204	1656	2012	Bovino	Corea del Sur	F
HQ530154	SD0805	603	2008	Bovino	China	HN
HQ530157	SD0805	697	2008	Bovino	China	M
HQ530155	SD0809	603	2008	Bovino	China	HN
HQ530158	SD0809	697	2008	Bovino	China	M
HQ530156	SD0811	603	2008	Bovino	China	HN
HQ530159	SD0811	697	2008	Bovino	China	M
U31671.1	SK217	3524	-N/A-	Bovino	Canadá	HN,F
KY511410.1	TR/Erz	309	2014	Bovino	Turquía	M
KU302388	TVMDL10	1719	2011	Bovino	EUA	HN
KU302362	TVMDL10	1623	2011	Bovino	EUA	F
KU302414	TVMDL10	1548	2011	Bovino	EUA	N
KU255510	TVMDL18	1719	2009	Bovino	EUA	HN
KU255496	TVMDL18	1623	2009	Bovino	EUA	F
KU255524	TVMDL18	1548	2009	Bovino	EUA	N
KT935305.1	TVMDL19	1719	-N/A-	Bovino	EUA	HN
KT935304	TVMDL19	1623	-N/A-	Bovino	EUA	F
KU302415	TVMDL19	1548	2012	Bovino	EUA	N
KU302389	TVMDL22	1719	2011	Bovino	EUA	HN
KU302363	TVMDL22	1623	2011	Bovino	EUA	F

KU302416	TVMDL22	1548	2011	Bovino	EUA	N
KU302390	TVMDL23	1719	2008	Bovino	EUA	HN
KU302364	TVMDL23	1623	2008	Bovino	EUA	F
KU302417	TVMDL23	1548	2008	Bovino	EUA	N
KU255511	TVMDL25	1719	2006	Bovino	EUA	HN
KU255497	TVMDL25	1620	2006	Bovino	EUA	F
KU255525	TVMDL25	1548	2006	Bovino	EUA	N
KU255472	TVMDL26	1719	2006	Bovino	EUA	HN
KU255461	TVMDL26	1623	2006	Bovino	EUA	F
KU255483	TVMDL26	1548	2006	Bovino	EUA	N
KU302391	TVMDL27	1719	2006	Bovino	EUA	HN
KU302365	TVMDL27	1623	2006	Bovino	EUA	F
KU302418	TVMDL27	1548	2006	Bovino	EUA	N
KU302392	TVMDL28	1719	2006	Bovino	EUA	HN
KU302366	TVMDL28	1623	2006	Bovino	EUA	F
KU302419	TVMDL28	1548	2006	Bovino	EUA	N
KU302393	TVMDL29	1719	2006	Bovino	EUA	HN
KU302367	TVMDL29	1623	2006	Bovino	EUA	F
KU302420	TVMDL29	1548	2006	Bovino	EUA	N
KU255512	TVMDL30	1719	2006	Bovino	EUA	HN
KU255498	TVMDL30	1623	2006	Bovino	EUA	F
KU255526	TVMDL30	1548	2006	Bovino	EUA	N
KU302394	TVMDL31	1719	2006	Bovino	EUA	HN
KU302368	TVMDL31	1623	2006	Bovino	EUA	F
KU302421	TVMDL31	1548	2006	Bovino	EUA	N
KU302395	TVMDL32	1719	2006	Bovino	EUA	HN
KU302369	TVMDL32	1623	2006	Bovino	EUA	F
KU302422	TVMDL32	1548	2006	Bovino	EUA	N
KU255513	TVMDL33	1719	2006	Bovino	EUA	HN
KU255499	TVMDL33	1623	2006	Bovino	EUA	F
KU255527	TVMDL33	1548	2006	Bovino	EUA	N
KU302396	TVMDL34	1719	2007	Bovino	EUA	HN
KU302370	TVMDL34	1623	2007	Bovino	EUA	F
KU302423	TVMDL34	1548	2007	Bovino	EUA	N
KU302397	TVMDL35	1719	2005	Bovino	EUA	HN
KU302371	TVMDL35	1623	2005	Bovino	EUA	F
KU302424	TVMDL35	1548	2005	Bovino	EUA	N
KU302398	TVMDL36	1719	2005	Bovino	EUA	HN
KU302372	TVMDL36	1623	2005	Bovino	EUA	F
KU302425	TVMDL36	1548	2005	Bovino	EUA	N
KU302399	TVMDL37	1719	2005	Bovino	EUA	HN

KU302373	TVMDL37	1623	2005	Bovino	EUA	F
KU302426	TVMDL37	1548	2005	Bovino	EUA	N
KU302400	TVMDL38	1719	2005	Bovino	EUA	HN
KU302374	TVMDL38	1623	2005	Bovino	EUA	F
KU302427	TVMDL38	1548	2005	Bovino	EUA	N
KU302401	TVMDL39	1719	2005	Bovino	EUA	HN
KU302375	TVMDL39	1623	2005	Bovino	EUA	F
KU302428	TVMDL39	1548	2005	Bovino	EUA	N
KU255514	TVMDL40	1719	2005	Bovino	EUA	HN
KU255500	TVMDL40	1623	2005	Bovino	EUA	F
KU255528	TVMDL40	1548	2005	Bovino	EUA	N
KU302402	TVMDL41	1719	2005	Bovino	EUA	HN
KU302376	TVMDL41	1623	2005	Bovino	EUA	F
KU302429	TVMDL41	1548	2005	Bovino	EUA	N
KU255473	TVMDL42	1719	2004	Bovino	EUA	HN
KU255462	TVMDL42	1623	2004	Bovino	EUA	F
KU255484	TVMDL42	1548	2004	Bovino	EUA	N
KU302403	TVMDL43	1719	2004	Bovino	EUA	HN
KU302377	TVMDL43	1623	2004	Bovino	EUA	F
KU302430	TVMDL43	1548	2004	Bovino	EUA	N
KU302404	TVMDL48	1719	2005	Bovino	EUA	HN
KU302378	TVMDL48	1623	2005	Bovino	EUA	F
KU302431	TVMDL48	1548	2005	Bovino	EUA	N
KU302405	TVMDL50	1719	2011	Bovino	EUA	HN
KU302379	TVMDL50	1623	2011	Bovino	EUA	F
KU302432	TVMDL50	1548	2011	Bovino	EUA	N
KU255515	TVMDL52	1719	2005	Bovino	EUA	HN
KU255501	TVMDL52	1623	2005	Bovino	EUA	F
KU255529	TVMDL52	1548	2005	Bovino	EUA	N
KU255474	TVMDL53	1719	2005	Bovino	EUA	HN
KU255463	TVMDL53	1623	2005	Bovino	EUA	F
KU255485	TVMDL53	1548	2005	Bovino	EUA	N
KU302406	TVMDL55	1719	2001	Bovino	EUA	HN
KU302380	TVMDL55	1623	2001	Bovino	EUA	F
KU302433	TVMDL55	1548	2001	Bovino	EUA	N
KU255475	TVMDL56	1719	2001	Bovino	EUA	HN
KU255464	TVMDL56	1623	2001	Bovino	EUA	F
KU255486	TVMDL56	1548	2001	Bovino	EUA	N
KU302407	TVMDL57	1719	2000	Bovino	EUA	HN
KU302381	TVMDL57	1623	2000	Bovino	EUA	F
KU302434	TVMDL57	1548	2000	Bovino	EUA	N

KU302408	TVMDL59	1719	1995	Bovino	EUA	HN
KU302382	TVMDL59	1623	1995	Bovino	EUA	F
KU302435	TVMDL59	1548	1995	Bovino	EUA	N
KU255516	TVMDL61	1719	2007	Bovino	EUA	HN
KU255502	TVMDL61	1623	2007	Bovino	EUA	F
KU255530	TVMDL61	1548	2007	Bovino	EUA	N
KU302409	TVMDL62	1719	1987	Bovino	EUA	HN
KU302383	TVMDL62	1623	1987	Bovino	EUA	F
KU302436	TVMDL62	1548	1987	Bovino	EUA	N
KU302410	TVMDL63	1719	1987	Bovino	EUA	HN
KU302384	TVMDL63	1623	1987	Bovino	EUA	F
KU302437	TVMDL63	1548	1987	Bovino	EUA	N
KU255477	TVMDL64	1719	1986	Bovino	EUA	HN
KU255466	TVMDL64	1623	1986	Bovino	EUA	F
KU255488	TVMDL64	1548	1986	Bovino	EUA	N
KU255517	TVMDL65	1719	1988	Bovino	EUA	HN
KU255503	TVMDL65	1623	1988	Bovino	EUA	F
KU255531	TVMDL65	1548	1988	Bovino	EUA	N
KU302411	TVMDL66	1719	2004	Bovino	EUA	HN
KU302385	TVMDL66	1623	2004	Bovino	EUA	F
KU302438	TVMDL66	1548	2004	Bovino	EUA	N
KU255478	TVMDL68	1719	1985	Bovino	EUA	HN
KU255467	TVMDL68	1623	1985	Bovino	EUA	F
KU255489	TVMDL68	1548	1985	Bovino	EUA	N
KU255479	TVMDL70	1719	1993	Bovino	EUA	HN
KU255468	TVMDL70	1623	1993	Bovino	EUA	F
KU255490	TVMDL70	1548	1993	Bovino	EUA	N
KU255518	TVMDL71	1719	1993	Bovino	EUA	HN
KU255504	TVMDL71	1623	1993	Bovino	EUA	F
KU255532	TVMDL71	1548	1993	Bovino	EUA	N
KU302412	TVMDL73	1719	1993	Bovino	EUA	HN
KU302386	TVMDL73	1623	1993	Bovino	EUA	F
KU302439	TVMDL73	1548	1993	Bovino	EUA	N
KU255480	TVMDL75	1719	1988	Bovino	EUA	HN
KU255469	TVMDL75	1623	1988	Bovino	EUA	F
KU255491	TVMDL75	1548	1988	Bovino	EUA	N
KU255481	TVMDL76	1719	1988	Bovino	EUA	HN
KU255470	TVMDL76	1623	1988	Bovino	EUA	F
KU255492	TVMDL76	1548	1988	Bovino	EUA	N
KU255519	TVMDL78	1719	1989	Bovino	EUA	HN
KU255505	TVMDL78	1623	1989	Bovino	EUA	F

KU255533	TVMDL78	1548	1989	Bovino	EUA	N
KU255520	TVMDL80	1719	1989	Bovino	EUA	HN
KU255506	TVMDL80	1623	1989	Bovino	EUA	F
KU255534	TVMDL80	1548	1989	Bovino	EUA	N