



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA INMUNODOMINANTE  
DEL VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA (DVB) GENOTIPO 1  
Y 2 CON POTENCIAL DIAGNÓSTICO EN MÉXICO.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**PRESENTA:**

**TZAYHRI OSORIO GALLARDO**

Asesores:

Dr. Alejandro Benítez Guzmán

Dra. Luary Martínez Chavarría

Dr. Juan Heberth Hernández Medrano

Ciudad Universitaria, CDMX

2018



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.



Este proyecto de tesis se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, bajo la tutela del Dr. Alejandro Benítez Guzmán, la Dra. Luary Martínez Chavarría y el Dr. Juan Heberth Hernández Medrano.

Se trabajó dentro del laboratorio de Inmunofisiología y Proteómica a cargo del Dr. Alejandro Benítez Guzmán, el cual es parte del departamento de Microbiología e Inmunología. También se llevaron a cabo experimentos en el laboratorio de Patología Molecular, a cargo de la Dra. Luary Martínez Chavarría en el departamento de Patología. Los sueros de campo que se usaron durante el experimental fueron donados por el Banco Nacional de Sueros a cargo del Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar, parte del departamento de Reproducción Animal, a través de la M en C Ana Delia Rodríguez Cortez y el Dr. Juan Heberth Hernández Medrano. Los ensayos de cultivo celular se efectuaron en las instalaciones del laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis a cargo del Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello y la Dra. Beatriz Arellano Reynoso, mientras que las inoculaciones virales se realizaron en las instalaciones del laboratorio de Virología a cargo de la Dra. Liliana Valdés Vázquez.

El financiamiento económico para el desarrollo del trabajo experimental se obtuvo gracias a los proyectos CONACyT 247539 , PAPIIT IA205016, Fondo Semilla FMVZ y la beca tesis por parte de COMECyT.

# CONTENIDO

RESUMEN .....	1
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS.....	2
LISTA DE CUADROS.....	6
1 INTRODUCCIÓN .....	7
1.1 Generalidades e importancia clínica.....	7
1.2 Transmisión del agente infeccioso.....	7
1.3 Importancia económica y prevalencia de DVB.....	8
1.4 Características y biología molecular del VDVB.....	9
1.4.1 EXTREMO 5' UTR.....	10
1.4.2 EXTREMO 3' UTR.....	11
1.4.3 Proteínas Virales.....	11
1.4.3.1 Proteína N <sup>pro</sup> .....	12
1.4.3.2 Proteína C.....	13
1.4.3.3 Proteína E <sup>ms</sup> .....	13
1.4.3.4 Proteína E1 .....	13
1.4.3.5 Proteína E2 .....	14
1.4.3.6 Proteína p7.....	15
1.4.3.7 Proteína NS2.....	15
1.4.3.8 Proteína NS2/3.....	16
1.4.3.9 Proteína NS3.....	16
1.4.3.10 Proteína NS4A.....	16
1.4.3.11 Proteína NS4B.....	17
1.4.3.12 NS5A .....	17
1.4.3.13 Protína NS5B.....	17
1.5 Genotipos del VDVB .....	19
1.6 Métodos diagnósticos.....	21
1.6.1 Detección de antígeno .....	21
1.6.2 Detección de ácidos nucleicos.....	23
1.6.3 Detección de anticuerpos .....	23
1.7 Múltiplex – Luminex.....	25
2 JUSTIFICACIÓN.....	28

3 HIPÓTESIS.....	29
4 OBEJTIVO GENERAL.....	29
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1 Virus y líneas celulares.....	30
5.2 Crecimiento y mantenimiento de la línea celular MDBK (Mardin Darby Bovine Kidney) .....	30
5.3 Propagación Viral .....	31
5.4 Western Blot.....	32
5.5 Extracción de RNA y PCR .....	35
5.6 Secuenciación del producto amplificado con los iniciadores específicos para la glicoproteína E2.....	37
7 RESULTADOS.....	38
7.1 Validación del Modelo .....	38
7.2 Expansión de Cepas Virales.....	39
7.3 Reconocimiento de cepas virales por sueros.....	42
7.3.1 Enfrentamiento de cepas virales a sueros del estado de Guerrero.....	42
7.3.2 Evaluación de las diferentes cepas virales expuestas a sueros de diferentes estados.....	44
7.4 Esquematzación de reconocimiento de bandas .....	47
7.5 Amplificación del gen que codifica para E2.....	48
7.8 Secuenciación de producto amplificado con iniciadores específicos para E2 .....	50
8 DISCUSIÓN.....	51
9 CONCLUSIÓN .....	57
10 PERSPECTIVAS.....	58
11 REFERENCIAS .....	58
ANEXOS.....	65
ANEXO 1.....	65

## RESUMEN

El virus de Diarrea viral bovina causa, anualmente, grandes pérdidas económicas a nivel mundial; las diferencias genéticas entre cepas del virus repercuten a nivel antigénico, se ha demostrado que la mezcla de genotipos y subtipos en México es única en América del Norte, los métodos diagnósticos serológicos utilizados en el país son diseñados para otras naciones, por lo que podría existir un porcentaje de falsos negativos. En el presente estudio se pretende identificar una proteína en común entre algunas cepas del genotipo 1 y 2 del VDVB que sea reconocida antigénicamente por bovinos mexicanos infectados pertenecientes a diferentes regiones del país. Al enfrentar, por medio de la técnica de WB, las cepas NADL, NY y una cepa de aislamiento nacional (DVB2) a sueros de campo de animales sin vacunar de distintos estados, así como a un suero comercial, se demostró que existen diferencias antigénicas marcadas que evitan elegir una sola proteína con potencial recombinante que sirva para el diagnóstico de las diferentes cepas en el país, aun así, la tendencia de reconocimiento en este estudio se inclina a las cepas NY y DVB2, por lo que con base a información bibliográfica se realizaron RT-PCRs que proponen a E2 de la cepa NY como candidata a proteína recombinante.

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

---

### **B**

- BLAST Basic Local Search Tool
- BSA Albúmina sérica bovina
- BT: Células turbinato bovino
- BVDV, Bovine Viral Diarrhoea Virus (Virus de Diarrea Viral Bovina)

---

### **C**

- C+ Control positivo
- CAB Complejo abortivo bovino
- CRB Complejo respiratorio bovino
- CSFV Classic Swine Fever Virus (virus de la fiebre porcina clásica)

---

### **D**

- DICC 50%: Dosis infectante para el 50% del cultivo celular
- DMEM Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium (Medio Eagles mínimo esencial dulbeco modificado)
- DVB Diarrea viral bovina
- DVB2 cepa de aislamiento nacional por el Dr. Ángel Retana

---

### **E**

- ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzimo-inmuno ensayo)

---

### **H**

- HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinaetanosulfónico)

---

### **I**

- IBT Instituto de Biotecnología, UNAM
- IgG, Inmunoglobulina G
- INF-1 Interferon 1
- INIFAP Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
- IPMA Inmunoperoxidasa por anticuerpos monoclonales
- IRES Internal Ribosome Entry Site (Sitio interno de entrada al ribosoma)
- IRF-3 Interferon Regulatory Factor 3 (Factor 3 Regulatorio del interferón)

---

### **K**

- KDa Kilodaltones

---

### **M**

- MDBK, Madi-Darbin Bovine Kidney cells (células de riñón bovino Madi-Darbin)
- mRNA RNA mensajero
- MW\* molecular weight (peso molecular)

\* En este estudio las siglas son usadas para referirse al control de peso molecular o al control de pares de bases según sea el caso

---

## **N**

- NCBI National Center for Biotechnology Information
- NTPasa Nucleosido trifosfatasa
- NV, Virus neutrización
- NY, New York

---

## **O**

- OIE Organización mundial de sanidad animal
- ORF Open Reading Frame (Marco abierto de lectura)

---

## **P**

- PI: persistentemente infectado
- p.i, Post Infección
- PABP Poli (A) Binding Protein (proteína de unión a poli (A))
- PAMPs Pathogen-associated molecular patterns (patrones asociados a patógenos)
- pb, pares de bases
- PBS, Phosphate-buffered saline (Tampón fosfato-salino)
- PCR Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
- PI Persistentemente Infectado
- PVDF Polivinilideno fluoruro

---

## **R**

- RdRP, RNA dependant RNA Polimerase (Polimerasa de RNA dependiente de RNA)
- RE Reticulo Endoplasmático
- RT-PCR, Polimerase Chain Reaction with Reverser Transcriptase (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa)

---

## **S**

- SDS, Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecilsulfato de sodio)
- SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)
- SFB, Suero Fetal Bovino
- SN, Suero Neutralización (seroneutralización)

---

## **T**

- TAE, Tris-acetate-EDTA Buffer (Tampón Tris- acetato con EDTA)
- TBE, Tris-borate-EDTA Buffer (Tampón Tris- borato con EDTA)
- tRNA, RNA de transferencia

---

## **U**

- UTR, Untranslates region (Región no traducida)



---

**V**

- VDVB, Virus de diarrea viral bovina
- VDVB-1, Virus de diarrea viral bovina genotipo 1
- VDVB-2, Virus de diarrea viral bovina genotipo 2

- VDVB-3, Virus de diarrea viral bovina genotipo 3

---

**W**

- WB, Western Blot

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Esquematación de una partícula viral de Pestivirus así como las proteínas virales resultantes de la traducción del RNA viral y los sitios de procesamiento de cada una de ellas. (Tautz et al. 2015)	9
Figura 2. Morfología de MDBK infectadas por ambos biotipos del virus de diarrea viral bovina A. Biotipo citopático B. Biotipo no citopático	11
Figura 3. Árbol filogenético de VDVB basado en la región no traducida 5'. Las secuencias de nucleótidos mexicanas están etiquetadas con el símbolo "♦". (Gómez-Romero <i>et al.</i> , 2017)	20
Figura 4. Ejemplo de gráfica de curva tipo de BSA para la cuantificación de proteína de MDBK sin infectar	33
Figura 5. Representación de un lote de Precision Plus Protein Dual Color Standards	33
Figura 6. Representación del control de pares de bases GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA, SM0312.	36
Figura 7 a) Cultivo de MDBK a 24, 48, 72 y 96 horas luego de haber agregado medio DMEM 2% SFB, b) RT-PCR (Gel agarosa 1.8%, 100V, TBE) con oligonucleótidos específicos contra fracción 5'UTR de 293 pb. La figura muestra la presencia de 1 amplicón en el carril del control positivo. MW: 1 Kb Plus (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), C+: Vacuna Bovimune 5 (Lapisa, La piedad, México), C-: PBS	38 -39
Figura 8 Cultivo en medio DMEM con suero fetal bovino al 2% a 24, 48, 72 y 96 horas después de infección con las cepas a) NADL. b) New York c) Cepa de campo (aislado nacional; DVB2). Para la cepa NADL se observan zonas sugerentes a lisis células desde las 72 horas p.i.	40
Figura 9. PCR diagnóstico contra la fracción conservada 5'UTR de 293 pb. Las extracciones de RNA quedaron dentro del intervalo para el coeficiente A260/A280 de 2.05 a 2.12 y para el coeficiente A260/A230 de 1.82 a 2.0. Gel agarosa 1.8% (100V, TAE, 30 mins). MW GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA, SM0312), C+: Vacuna Bovimune 5 (Lapisa, La piedad, México), C-: PBS	41
Figura 10 Western blots de diferentes cepas del VDVB incubados con suero positivo comercial contra VDVB: a) Cepa NADL; b) Cepa de Campo (DVB2) y c) Cepa New York	42
Figura 11 Western blots de las diferentes cepas del VDVB incubados con dos grupos de sueros positivos contra DVB de animales no vacunados del Estado de Guerrero. a) cepa NADL; b) cepa de campo (DVB2); y, c) Cepa Nueva York.	43
Figura 12 Western blots de cepas de NADL, DVB2 y New York contra un grupo de sueros de 5 distintos estados: a) Chiapas, b) Durango, c) Tamaulipas, d) Veracruz y e) Zacatecas.	44-46
Figura 13 Comparación esquemática de las bandas obtenidas en los WBs empleando los grupos de sueros positivos de diferentes estados (Chiapas, Durango, Guerrero (Pool 1 y 4), Tamaulipas, Veracruz y	47

Zacatecas) incubados con las diferentes cepas del VDVB (NADL, cepa de campo (DVB2) y Nueva York). Además, se muestra un patrón virtual de referencia de todas las proteínas virales (carril 2 y cuadro derecha)	
Figura 14. RT-PCR con iniciadores específicos para E2. (Agarosa 1.8%, TAE 1x, 100V, 45 mins) La literatura reporta que el producto esperado con dichos iniciadores es de 1139 pb. MW: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA, SM0312), C+: Vacuna Bovimune 5 (Lapisa, La piedad, México)	48
Figura 15. Gel agarosa 1.8%, TAE 1x, 100V, 45mins. Se muestran 5 distintas extracciones de la cepa New York cargadas en la reacción al máximo volumen posible (5µl) para asegurar presencia suficiente del templado en todos los casos. Se evidencia la presencia de una banda mayor a 1000 pb en todos los carriles. MW: GeneRuler 1kb DNA Ladder	49
Figura 16. Gel agarosa 1.8%, TAE 1x, 100V, 45 mins. Se cortó la zona donde se encontraban las bandas amplificadas de E2 en las reacciones de la cepa New York de la reacción pasada y con el protocolo de extracción de gel del QIAquick Gel Extraction kit se purificaron dichas bandas; como prueba de correcta purificación observamos la presencia de una sola banda superior a 1000 pb. MW: GeneRuler 1kb DNA Ladder.	50

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1: Pesos moleculares de proteína virales y resumen de sus atributos	18
Cuadro 2. Secuencias y tamaño de fragmentos esperados para los iniciadores específicos de VDVB	36
Cuadro 3. Parámetros específicos para cada tipo de oligonucleótido empleado.	37

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades e importancia clínica

El virus de la Diarrea viral bovina (VDVB) puede encontrarse tanto en rumiantes domésticos, como silvestres (*Bovidae*, *Cervidae*, *Camelidae*, *Antilocapridae*, *Ovidae*, *Giraffidae*), aunque también se han reportado a cerdos como portadores. Si bien la tasa de mortalidad alcanzada por la infección de este virus es baja, la morbilidad por el otro lado puede llegar a ser mayor al 90% provocando que la dispersión del agente sea difícil de controlar y que la enfermedad este ampliamente distribuida a nivel mundial. (Solis-Calderon, Segura-Correa and Segura-Correa, 2005; Safarpour Dehkordi, 2011) La diarrea viral bovina está asociada a una amplia gama de manifestaciones clínicas en el ganado; las afecciones pueden ir desde cuadros agudos hasta mortales, entre ellos se encuentran graves problemas respiratorios, desórdenes gastrointestinales, síndromes hemorrágicos y complicaciones reproductivas como reabsorciones, abortos, momificaciones, mortinatos, becerros débiles, malformaciones congénitas, individuos persistentemente infectados, infertilidad, aumento de días abiertos y disminución en la producción láctea. (Solis-Calderon, Segura-Correa and Segura-Correa, 2005; Ávila García and Cruz Hernández, 2007; López Pérez, 2014; Gómez-Romero *et al.*, 2017) .

## 1.2 Transmisión del agente infeccioso

El agente infeccioso es excretado en todas las secreciones de un animal infectado; es decir, saliva, lágrimas, heces, orina, descargas nasales, semen, etc. La transmisión se puede dar por contacto directo entre animales o, indirectamente, a través de objetos o comida contaminada.

Además de la transmisión horizontal, mencionada anteriormente, el virus es capaz de atravesar la placenta, el resultado sobre el producto depende del estadio

en que se encuentre la gestación. Cuando la infección con una cepa no citopática ocurre de los 60 a 120 días, el producto genera tolerancia inmunológica al VDVB, dando como resultado un individuo persistentemente infectado (PI) (Ávila García and Cruz Hernández, 2007; Kelling and Topliff, 2013; Tautz, Tews and Meyers, 2015) quien posee viremia persistente y es una de las principales fuentes de infección para el demás ganado. DVB también causa inmunosupresión transitoria en cuadros agudos, lo que predispone a infecciones concomitantes, por lo que se encuentra a VDVB como parte de los complejos respiratorio bovino (CRB) y abortivo bovino (CAB).

### 1.3 Importancia económica y prevalencia de DVB

No hay información publicada con respecto a las pérdidas económicas en México por VDVB, sin embargo, hay publicaciones europeas que citan pérdidas económicas de entre €13 a €552 por vaca al año dependiendo de la presentación de la enfermedad; también se han reportado artículos donde se estudian las mermas a nivel mundial, por mencionar algunos ejemplos, en estos se habla de intervalos de £21.32 y £42.63 en hatos lecheros y de £26.78 a £53.56 en hatos de engorda por vaca al año en 2015 para el caso de Inglaterra; en el caso de EUA se cita una suma de aproximadamente \$44.66 USD por vaca al año durante el 2014 o la situación de los Países Bajos en el transcurso del 2015 en la que se presentaron bajas de €30.8 por vaca al año (Fourichon *et al.*, 2005; Yarnall and Thrusfield, 2015). La información sobre la prevalencia del agente infeccioso en México también es escasa, sin embargo, monitoreos a través de pruebas serológicas por parte del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) han resultado en la publicación durante los años 2013 y 2014 de un intervalo de seroprevalencia entre 39.25% y 96.40% en ranchos de la zona centro de Veracruz y en el caso del estado de Tabasco, se demostró un intervalo entre 45.58% a 85.42% dependiendo de la época del año (secas, nortes o lluvias)(Zárate Martínez *et al.*, 2013; Víctor *et al.*, 2014); según datos no publicados del proyecto “Desarrollo de un sistema inmuno-diagnóstico

multiplex para enfermedades infecciosas en ganado bovino en regiones tropicales” (Hernández-Medrano, 2015), la seroprevalencia en animales no vacunados de los estados de Chiapas, Tabasco, Tamaulipas, Guerrero y Veracruz oscila entre 67.2% y 92.6%.

#### 1.4 Características y biología molecular del VDVB

El término VDVB se refiere a virus envueltos poseedores de una cadena de RNA que corre en sentido positivo clasificados dentro del género *Pestivirus*, familia *Flaviridae*. Los géneros *Pegivirus*, *Hepacivirus* y *Pestivirus*, integrantes de la familia *Flaviridae*, poseen una biología muy similar, por ejemplo, éstos producen pequeños viriones que presentan una envoltura lipídica que a su vez rodea a la cápside, la cual contiene el genoma viral poseedor de un único marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés). La capa lipídica es obtenida de la membrana del retículo endoplásmico (RE) y posteriormente los viriones son expulsados por exocitosis (Ridpath, 2010; Jordan *et al.*, 2002). Los *Pestivirus* expresan viriones de entre 40 a 60 nm de diámetro, cuya capa lipídica es pleomórfica, dificultando la identificación de los viriones por microscopía electrónica (ver Figura 1). La cadena simple de RNA tiene un largo de aproximadamente 12.3 kb, la cual se traduce en una poliproteína que es procesada traduccionalmente y post-traduccionalmente por proteasas virales y celulares a 12 proteínas virales maduras. El RNA genómico es el único RNA viral encontrado en células infectadas, implicando que la cadena positiva de RNA viral funge como RNA mensajero (mRNA) y a partir de él se traducen las proteínas virales. El ORF, sección genómica que codifica a las proteínas, esta precedido por la región no traducida 5' (5' UTR por sus siglas en inglés), seguido por la región no traducida 3' (3' UTR por sus siglas en inglés) de 360-390 nucleótidos y de 200 – 240 nucleótidos, respectivamente. El extremo 5' UTR carece de capuchón y aunque el extremo 3' UTR no posee una cola poli adenosinas (poli (A)), el genoma de los *pestivirus* tiene una cola corta de poli citosinas (poli (C)). (Ridpath, 2010; Tautz *et al.*, 2015)

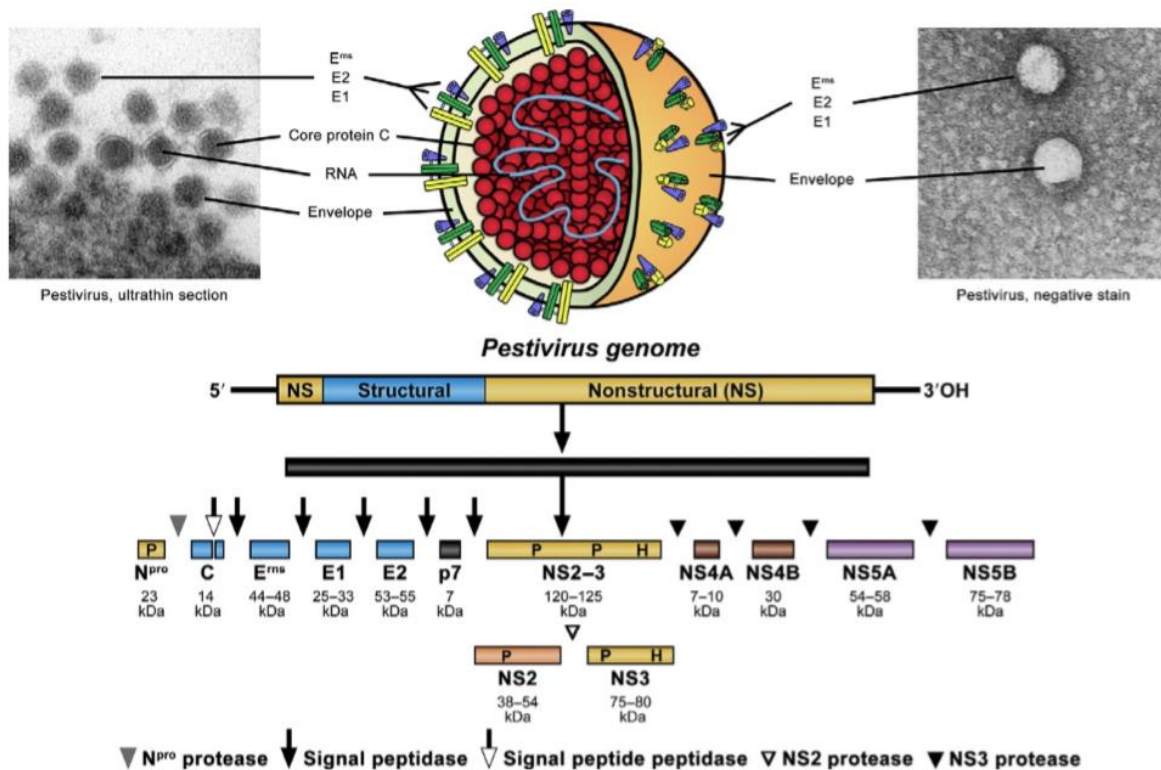


Figura 1. Esquematización de una partícula viral de Pestivirus así como las proteínas virales resultantes de la traducción del RNA viral y los sitios de procesamiento de cada una de ellas. (Tautz *et al.*, 2015)

#### 1.4.1 EXTREMO 5' UTR

En los Pestivirus, el extremo 5'UTR inicia con una secuencia capaz de mantener una estructura estable en forma de horquilla, llamada horquilla 1a ó hairpin 1a. En experimentos con VDVB se encontró que el la tiene una bifuncionalidad en el inicio de la traducción y la replicación del RNA viral. Los virus dependen completamente de la maquinaria de replicación de la célula eucarionte en la cual el capuchón de 7-metilguanosa (capuchón 5') es donde se ensambla la subunidad 43S ribosomal (subunidad ribosomal 40S más RNA de transferencia (tRNA) unido a una metionina y factores de iniciación) y promueve el inicio de la traducción en el codón AUG inmediato (codón de inicio)(Karp, 2013), al carecer de un capuchón 5', para garantizar una traducción eficiente, el RNA de los pestivirus contiene un "sitio interno de entrada al ribosoma" (IRES por sus siglas en inglés) que es capaz de reclutar la subunidad pequeña ribosomal y posicionarla en el sitio de inicio de traducción, el IRES de los Pestivirus también es capaz de iniciar la

traducción aunque el codón de inicio este mutado y no sea un AUG. (Tautz *et al.*, 2015)

### 1.4.2 EXTREMO 3' UTR

Se piensa que la 3' UTR es el primer elemento en entrar en contacto con la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP por sus siglas en inglés). La RdRP es la última proteína codificada del ORF en el RNA pestiviral, por lo que se encuentra muy cerca de la 3' UTR; este extremo tiene grandes diferencias con un mRNA eucariote. En el mRNA de células eucariotas, la cola poli (A) funciona para la estabilización del mRNA (evita su rápida degradación), pero también ayuda en la correcta traducción, ya que esta pseudocirculariza el RNA por medio de la proteína de unión poli (A) (PABP por sus siglas en inglés) la cual interactúa tanto con el extremo 3' como con los factores de inicio unidos al capuchón 5', en los Pestivirus esta acción es reemplazada por proteínas del grupo NAFR, que son factores que pseudocircularizan el RNA viral, lo cual también puede ser crucial para la coordinación en la traducción y la síntesis de la cadena de RNA en sentido negativo. (Karp, 2013; Tautz *et al.*, 2015)

### 1.4.3 Proteínas Virales

La secuencia de proteínas traducidas por los pestivirus es la siguiente: N<sup>pro</sup>, C, E<sup>ms</sup>, E1, E2, p7, NS2 (NS2/3) NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Ridpath, 2010). Todos los Pestivirus pueden coexistir en dos biotipos, citopático y no citopático, según el daño causado a células en cultivo, observar Figura 2. En aquellas cepas citopáticas, la proteína NS2/3 es escindida en NS2 y NS3 debido a inserciones entre los códigos de ambas (Tautz *et al.*, 2015). Las proteínas estructurales son: C, E<sup>ms</sup>, E1 y E2; C es la proteína de la núcleo-cápside; E<sup>ms</sup>, E1 y E2 son glicoproteínas asociadas a la envoltura; E<sup>ms</sup> y E2 poseen determinantes antigénicos, aunque se desconoce si E<sup>ms</sup> posea epítomos neutralizantes importantes para el control de la enfermedad. La glicoproteína E2 es la proteína de estructura inmunodominante y posee epítomos neutralizantes que sirven en el control de la enfermedad. Dentro de las proteínas no estructurales se encuentra a la NS3 que también puede presentarse como NS2/3, dependiendo del biotipo de



cepa que se trate; ambas poseen epítomos inmunodominantes aunque no se ha encontrado que los anticuerpos contra estas proteínas tengan efecto neutralizante contra la infección (Goyal, 2005).

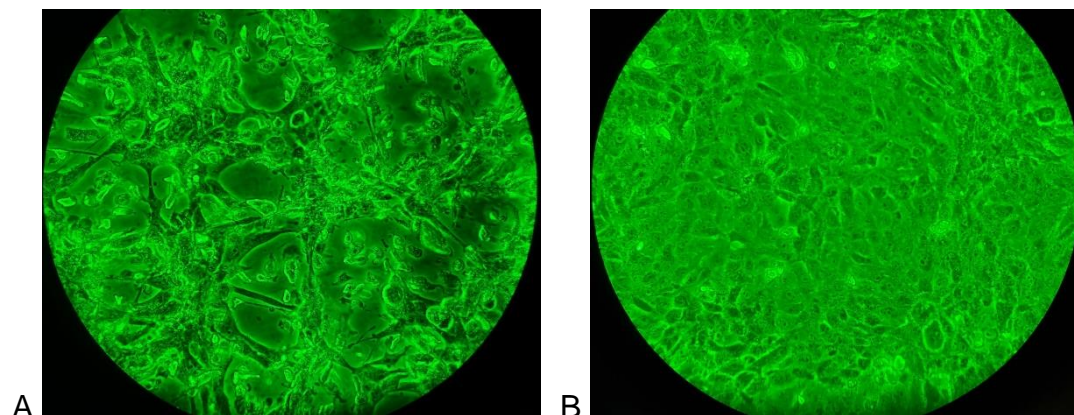


Figura 2. Morfología de células MDBK infectadas por ambos biotipos del virus de diarrea viral bovina A. Biotipo citopático B. Biotipo no citopático

#### 1.4.3.1 Proteína N<sup>pro</sup>

La primera proteína traducida del RNA viral es una no estructural llamada N<sup>pro</sup>, su nombre proviene de “N-terminal protease” y como su nombre lo indica, es una proteasa; es exclusiva de los Pestivirus y su actividad es escindir a ella misma en su extremo carboxilo. Posee aproximadamente 168 aminoácidos, no se considera una proteasa común ya que en vez de funcionar con una triada catalítica, su actividad depende de una díada catalítica (Tautz *et al.*, 2015). Se ha observado que N<sup>pro</sup> tiene la capacidad de proteger de la apoptosis a las células infectadas, esto lo logra por medio del bloqueo en el interferón tipo 1 (INF-1) de la célula hospedera. N<sup>pro</sup> reduce considerablemente el nivel intracelular de factor 3 regulatorio del interferón (IRF-3 por sus siglas en inglés) por medio de proteólisis, esto disminuye a su vez la señalización de los receptores tipo Toll que reconocen patrones morfológicos asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) al núcleo evitando así la secreción de INF-1. Estudios citan que N<sup>pro</sup> degrada al IRF-3 a través de la ruta proteosomal. (Tautz *et al.*, 2015)

### 1.4.3.2 Proteína C

La proteína C es la primera proteína estructural que se traduce, se refiere a la proteína de la núcleo- cápside. Su extremo N-terminal se forma al auto-escindirse N<sup>pro</sup>; C es seguida por una secuencia hidrofóbica que sirve como péptido señal para la traslocación de la proteína E<sup>ns</sup> dentro del RE. Al final del péptido señal se encuentra un motivo que es procesado por la señal peptidasa de la célula, como resultado queda una secuencia transmembranal que deja anclada a C; esta secuencia transmembranal, que es el péptido señal, es procesada por una péptido señal peptidasa (una proteasa intramembranal) que libera a C. En VDVB, C es una proteína intrínsecamente desordenada, se une al RNA con una baja afinidad y sin una clara especificidad. (Tautz *et al.*, 2015)

### 1.4.3.3 Proteína E<sup>ns</sup>

Sigue la proteína estructural E<sup>ns</sup> es la primera glicoproteína asociada a la envoltura, está anclada a la membrana y tiene una actividad de RNAsa. Esta glicoproteína es única de los Pestivirus, su anclaje se debe a que en su extremo carboxilo terminal posee una  $\alpha$ -hélice anfipática que la une a la membrana con una ligera inclinación. Se ha discutido que E<sup>ns</sup> es mediadora de la primera unión del virión a la célula debido a la interacción con glicosaminoglicanos. Esta proteína tiene una inusual actividad de ribonucleasa. Aunque se desconoce la función de la ribonucleasa en el ciclo de vida viral, los anticuerpos que inhiben la actividad de la ribonucleasa neutralizan la infectividad del virus de la peste porcina clásica (CSFV). E<sup>ns</sup> se puede encontrar tanto unida a la célula como en forma soluble. Se cree que la forma secretada ayuda a la evasión de la respuesta por interferón  $\beta$ , ya que se une y degrada RNA de doble cadena. Nueva evidencia muestra que glicoproteínas E<sup>ns</sup> unidas a células son internalizadas por medio de endocitosis media por clatrina. (Tautz *et al.*, 2015; Goyal, 2005; Ridpath, 2005)

### 1.4.3.4 Proteína E1

E1 es la única proteína de envoltura a la que no se le conoce estructura o función, los animales parecen no producir anticuerpos contra E1 y solo ha sido estudiada en función de las glicoproteínas E<sup>ns</sup> y E2. El extremo amino terminal es procesado

por la peptidasa señal de la célula, al igual que el sitio de escisión E1/E2. E1 forma un puente disulfuro con E2 formando heterodímeros y se ha propuesto que E1 posee un péptido de fusión. (El Omari *et al.*, 2013; Tautz *et al.*, 2015)

#### 1.4.3.5 Proteína E2

La proteína E2 representa el receptor de unión y el blanco principal de anticuerpos neutralizantes, es responsable del tropismo de especie en los Pestivirus, además de que un péptido derivado de la E2 mostró ser capaz de inhibir la infección por ocupación de receptores. El extremo carboxilo terminal de E2 posee una secuencia hidrofóbica que la ancla a la membrana. Tanto el extremo amino como el carboxilo son procesados por la señal peptidasa (Tautz *et al.*, 2015). Recientemente (El Omari *et al.*, 2013), se obtuvo la cristalografía de la glicoproteína, E2 representa una estructura larga (140 Å); los dominios más distales presentan plegamientos parecidos a Inmunoglobulinas, contra los cuales están dirigidos los anticuerpos neutralizantes. En ese estudio se mostró que un péptido de unión a célula hospedera concordó con una horquilla expuesta en el segundo dominio, sugiriendo que una unión al receptor CD46 puede estar ahí; otro descubrimiento (Tautz *et al.*, 2015) fue que encontraron una única histidina conservada entre las E2, la cual parece cambiar de orientación a pH 5, pudiendo así exponer la horquilla de unión a CD46. CD46 es excluido de los endosomas, pero VDVB entra a través de endocitosis mediada por clatrina, las células no permisivas se mantienen de esa forma incluso después de expresar CD46, aunque estas son capaces de replicar el genoma viral. (El Omari *et al.*, 2013; Tautz *et al.*, 2015) La gemación intracelular se ha propuesto durante mucho tiempo para los Pestivirus. Las tres glicoproteínas de la envoltura se retienen en las células (Burrack *et al.*, 2012; Grummer *et al.*, 2001; Köhl *et al.*, 2004), y los datos bioquímicos indican que las partículas virales se forman intracelularmente. La maduración de las cadenas de carbohidratos de las proteínas de la envoltura se produce durante el transporte de las partículas a lo largo de la ruta secretora hacia la superficie de la célula. Las partículas virales también pudieron ser

detectados en los sacos del aparato de Golgi y fuera de las células. (Schmeiser *et al.*, 2014).

La replicación ocurre en estrecha asociación con las membranas del RE. De acuerdo con esta estrategia de replicación, se cree que la mayoría de las proteínas virales, incluidos las no estructurales, con la excepción de Npro, se asocian con las membranas intracelulares, ya sea directa o indirectamente a través de interacciones con la membrana. (Ridpath, 2005)

#### **1.4.3.6 Proteína p7**

La proteína no estructural p7 es liberada de la poliproteína gracias a la señal peptidasa, debido a sus características hidrofóbicas y que es una pequeña proteína de membrana, se ha sugerido que p7 es una viroporina que funciona como un canal de iones (Gonzalez & Carrasco, 2003) Se ha descubierto una actividad del canal iónico de p7 en la inducción / liberación de citoquinas proinflamatorias de macrófagos infectados, lo que indica que, además de apoyar la formación del virión, la alteración de la homeostasis iónica también influye en las funciones celulares básicas (Lin *et al.*, 2014) . Un inhibidor de molécula pequeña del canal iónico p7 mostró actividad antiviral contra BVDV (Luscombe *et al.*, 2010).

#### **1.4.3.7 Proteína NS2**

En cepas de biotipo citopático se forma la proteína no estructural NS2, la cual posee aproximadamente 450 aminoácidos. La mitad más cercana al extremo amino terminal es altamente hidrofóbica y puede llegar a tener hasta 7 segmentos transmembranales que son seguidos por un dominio citoplasmático. Se considera que la sección citoplasmática de NS2 posee funciones de proteasa, siendo esta actividad dependiente de una triada catalítica. La función proteolítica de NS2 se restringe a la escisión de NS2/NS3, debido que al cortar, el extremo carboxilo queda dentro del dominio de la proteasa, evitando así que esta siga funcionando. (Lackner *et al.*, 2006).

#### 1.4.3.8 Proteína NS2/3

En las cepas no citopáticas es más sencillo encontrar a la proteína no estructural NS2/3. Aunque no está bien dilucidado cómo, la proteína no escindida NS2/3 juega un papel esencial en la morfogénesis de los viriones, ya que en estudios se demostró que la ausencia de NS2/3 fue relacionado con la incapacidad de generar progenie viral infecciosa, aunque haya una correcta replicación del RNA. (Tautz *et al.*, 2015)

#### 1.4.3.9 Proteína NS3

La proteína no estructural NS3 es multifuncional. En el dominio del extremo amino terminal, se encuentra una serine-proteasa, mientras que en el carboxilo terminal se encuentra una helicasa y una nucleosido trifosfatasa (NTPasa). Para que NS3 pueda obtener su actividad completa de proteasa, necesita la asociación con el dominio central de su cofactor NS4A; una vez asociadas NS3/4A escinden en el extremo carboxilo terminal de NS3 y todos los subsecuentes sitios de corte, liberando a NS4B, NS5A y NS5B (Tautz *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1997; Wiskerchen & Collett, 1991) En el dominio corriente abajo de NS3 se encuentra una helicasa tipo DEXH y una NTPasa, las cuales son esenciales para la replicación del RNA viral (Grassmann *et al.*, 1999; Tamura, *et al.*, 1993; Warrenner y Collett, 1995). Se observó la actividad de unión a RNA de NS3 que, sin embargo, no era específica para RNA viral (Grassmann *et al.*, 1999).

#### 1.4.3.10 Proteína NS4A

NS4A contiene una región amino terminal hidrofóbica que se ancla a la membrana y un dominio citosólico en la región del extremo carboxilo terminal (Liang *et al.*, 2009). NS4A representa al cofactor de la proteasa de NS3, pero además de esta función, estudios también revelaron un papel crítico de NS4A en la morfogénesis del virión (Agapov *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2009; Moulin *et al.*, 2007). Para ambas funciones, la interacción íntima conocida entre NS4A y NS3 es muy probable que sea de importancia crítica (Tautz *et al.*, 2000).

#### 1.4.3.11 Proteína NS4B

NS4B es una proteína hidrofóbica con topología de membrana desconocida que ejerce una función esencial pero no bien caracterizada en la replicación del RNA pestiviral, de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, NS4B se predice como una proteína de membrana integral localizada en las membranas intracelulares.

#### 1.4.3.12 Proteína NS5A

La proteína NS5A posee un  $\alpha$  hélice anfipática que permite su anclaje en la membrana. Dentro de esta proteína, investigadores pudieron encontrar tres regiones que son necesarias para la unión de NS5B. (Tautz, *et al.*, 2015)

#### 1.4.3.13 Proteína NS5B

NS5B es la última proteína en ser traducida. Muestra características de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) que ha mostrado actividad de polimerasa en estudios *in vitro*. Sin embargo, *in vivo*, la replicación del genoma viral requiere la acción concertada de NS3 a NS5B para la síntesis de RNA viral. La estructura cristalizada de NS5B se determinó para dos cepas de BVDV (Choi, *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2004). Se asemeja a una mano derecha con los dedos, la palma de la mano y el pulgar y por lo tanto exhibe el pliegue general típico de RdRps y otras polimerasas.

Los nombres de las proteínas virales han cambiado con el tiempo, en el Cuadro 1 se hace uso de los nombres designados en el Séptimo Informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Los primeros estudios de VDVB informaron de dos polipéptidos estructurales glicosilados, con pesos moleculares de 55 K y 45 K, que se denominaron VP1 y VP2, respectivamente (Matthaeus, 1979). Las revisiones posteriores se refieren a estas proteínas como E1 y E2 (Westaway *et al.*, 1985). Cuando Collett *et al.* resolvió el primer mapa genómico para BVDV, los productos génicos se designaron por sus pesos moleculares y el estado de glicosilación (Collett *et al.*, 1988b). Por lo tanto, la proteína viral ahora conocida como E2, se puede denominar VP1, E1 o gp53 en la literatura. Del mismo modo, E<sup>ms</sup> puede informarse como VP2, E0, E2 o gp4.

Cuadro 1: Pesos moleculares de proteína virales y resumen de sus atributos				
Proteína Viral	Tamaño estimado (KDa)	Atributos	Epitopo Neutralizante (S/N)	Función
<b>N<sup>pro</sup></b>	20	No estructural	N	Autoproteolisis No requerida para replicación de RNA
<b>C</b>	14	Estructural Conservada Altamente básica	N	Forma nucleocápside del virion
<b>E<sup>ns</sup></b>	48	Estructural 7-9 sitios de glicosilación	S	Glicoproteína asociada a la envoltura Actividad de ribonucleasa
<b>E1</b>	25	Estructural 2-3 sitios de glicosilación	N	Glicoproteína asociada a la envoltura. Proteína integral de la membrana
<b>E2</b>	53	Estructural 4-6 sitios de glicosilación La menos conservada	S	Glicoproteína asociada a envoltura. Proteína integral de la membrana Proteína estructural inmunodominante
<b>p7</b>	7	No estructural Región central cargada flanqueada por el extremo hidrofóbico	N	Función desconocida Requerida para la producción de virus infeccioso pero no para replicación de RNA
<b>NS2/3</b>	125	No estructural	N	NS2 tiene un dominio ligado a zinc. NS2/3 y NS3 contienen dominios de RNA helicasa y uno de serine proteasa en el extremo N terminal, son proteínas no estructurales Proteína no estructural inmunodominante
<b>NS2</b>	54	NS2/3 escindida en biotipo citopático	N	
<b>NS3</b>	80	NS2/3 escindida en biotipo citopático	N	
<b>NS4A</b>	72	No estructural Hidrofóbica	N	Cofactor de la serine proteasa
<b>NS4B</b>	38-39	No estructural Hidrofóbica	N	Componente de la replicasa
<b>NS5A</b>	55-56	No estructural Fosforilada	N	Componente de la replicasa
<b>NS5B</b>	81-82	No estructural	N	Polimerasa de RNA dependiente de RNA

Tomado de Ridpath, 2005

### 1.5 Genotipos del VDVB

En el caso de VDVB se reconocen 2 genotipos, VDVB-1 y VDVB-2 (BVD-1 y BVD-2 por sus siglas en inglés), aunque se han encontrado algunos Pestivirus atípicos, conocidos como Pestivirus tipo HoBi o VDVB-3 (BVD-3 por sus siglas en inglés) que fueron encontrados por primera vez en suero fetal bovino (SFB) proveniente de Brasil (Tautz *et al.*, 2015). La identidad en las secuencias entre VDVB-1 y VDVB-2 es más alta en la 5'UTR (Ridpath, 2005); se piensa que esto es debido a la conservación de secuencias necesarias para la traducción y replicación alojadas en esta región. Se reconocen dos zonas principales de alta variación en las secuencias entre VDVB-1 y VDVB-2, éstas están localizadas entre los nucleótidos 208-223 y entre los nucleótidos 294-323; las variaciones en estas secuencias se han explotado para su uso en la diferenciación de genotipos con técnicas tipo PCR (Goyal, 2005). Las primeras dos cepas secuenciadas fueron la Osloss en 1987 y la NADL en 1988, ambas citopáticas, la cepa BVD1a-SD-1 fue la primera cepa no citopática secuenciada, no contiene inserciones, por lo que se usa como referencia para el conteo de nucleótidos (Ridpath, 2005).

Aunque la segregación en 2 genotipos se hizo filogenéticamente, la caracterización de cepas de ambas especies mostró la existencia de diferencias antigénicas. El significado práctico de las diferencias antigénicas se evidenció en la falla de las vacunas y de los diagnósticos basados en DVB1 para detectar y controlar DVB2. El análisis filogenético de DVB1 y DVB2 ha revelado la existencia de subgenotipos, aproximadamente 12 y 2 respectivamente, aunque aún se han estado descubriendo más subgenotipos que falta asignarles nombre (Goyal, 2005) también se han descubierto diferencias antigénicas entre subgenotipos. Últimamente se han reportado 16 subtipos para DVB1 (1a-1r) y 4 para DVB2 (2a-2d)(Oguzoglu *et al.*, 2017). Las secuencias reportadas en México se observan en la Figura 3.





Figura 3. Árbol filogenético de VDV B basado en la región no traducida 5'. Las secuencias de nucleótidos mexicanas están etiquetadas con el símbolo "♦".(Gómez-Romero *et al.*, 2017)

## 1.6 Métodos diagnósticos

El diagnóstico del VDVB puede hacerse algunas veces basándose en la historia clínica y en signología presentada por el animal, sin embargo, los signos clínicos que siguen a la infección con VDVB son muy variables dependiendo de la cepa, edad, el estado inmune del hospedero, el estado reproductivo del animal y a presencia de otros patógenos, por lo que la detección precisa y definitiva del virus depende del diagnóstico de laboratorio (OIE., 2013). Existen varios tipos de técnicas diferentes para la detección del antígeno, anticuerpos y componentes virales (como ácidos nucleicos) del VDVB, los cuales se describen a continuación.

### 1.6.1 Detección de antígeno

Las pruebas para la detección directa del antígeno en tejido fresco, congelado o fijado pueden ser ELISA, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. En la inmunofluorescencia, secciones cortadas con criostato de tejidos frescos o frotis de las células de la capa leucocitaria se tiñen con anticuerpos anti-BVDV conjugados con fluoresceína y luego son examinados bajo un microscopio fluorescente (Goyal, 2005).

La inmunohistoquímica puede realizarse en frotis de leucocitos de sangre periférica a través de un protocolo de inmunoperoxidasa. Deregt y Prins (1998) desarrollaron un ensayo de monocapa de inmunoperoxidasa basada en anticuerpos monoclonales (IPMA) para la detección de BVDV y lo comparó con un IPMA basado en anticuerpos policlonales de bovinos. Se encontró que el IPMA de anticuerpos monoclonales superaba al IPMA de los anticuerpos policlonales en la tinción, facilidad de lectura de los resultados de las pruebas y en su sensibilidad relativa. La inmunohistoquímica de biopsias de piel se utiliza para diagnosticar animales persistentemente infectados, aunque esta técnica también se puede aplicar en animales muertos utilizando muestras de la glándula tiroides, piel, mucosa oral, esófago o abomaso (Goyal, 2005; OIE, 2013). La tinción de inmunohistoquímica de los tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina es un método eficiente para la detección de VDVB y a menudo se considera mejor que la histopatología. Los métodos de marcaje con enzima son útiles para detectar

antígeno de BVDV en cortes de tejido, particularmente cuando se dispone de anticuerpos monoclonales adecuados. Para ganado infectado persistentemente puede usarse casi cualquier tejido, pero se obtienen mejores resultados con nódulos linfáticos, tiroides, piel, cerebro, cuarta cavidad del rumen y placenta. Se ha demostrado que las biopsias de la piel, como las obtenidas por incisión en la oreja, son útiles para el diagnóstico in-vivo de la infección persistente por VDVB (Goyal, 2005; OIE., 2013)

El aislamiento viral es una de las pruebas prescritas para el comercio internacional por la OIE (OIE., 2013), considerado el método más confiable para la detección de VDVB en cultivos celulares. Durante la viremia, el virus puede ser aislado de secreción nasal, heces y pulmones. El semen, sangre, suero, fetos y heces pueden usarse para aislamiento viral. Las células más usadas para el aislamiento viral son las turbinato bovino (BT) debido a que son más sensibles a los efectos citopáticos causados por el VDVB (Goyal, 2005). Las células leucocitarias, la sangre completa, los leucocitos lavados o el suero son adecuados para el aislamiento del virus de animales vivos. Los anticuerpos maternos pueden interferir con el aislamiento del suero en terneros jóvenes. El semen puro es citotóxico y debe diluirse en medio de cultivo.

Muchas técnicas de enzimo-inmuno ensayo se han realizado al paso del tiempo para la detección directa del agente patógeno en células del paquete leucocitario, suero y muestras de oreja. El principio básico consiste en el uso de anticuerpos monoclonales, para la captura del antígeno viral que es seguido por la detección del complejo antígeno-anticuerpo a través del uso de un anticuerpo conjugado. Las ELISA más comúnmente utilizadas de captura de anticuerpo son aquellas que utilizan un anticuerpo monoclonal específico contra la región antigénica conservada de la proteína no estructural NS2/3 de los Pestivirus, posteriormente el antígeno capturado es detectado por un anticuerpo específico para Pestivirus policlonal conjugado con peroxidasa. Se ha encontrado que estas pruebas arrojan resultados comparables a los del aislamiento viral. La prueba es adecuada para la detección de animales infectados persistentemente y por lo general mide el

antígeno de DVB en lisados de leucocitos periféricos de la sangre; la nueva generación de los ELISA de captura de antígenos (ELISA de captura E<sup>ms</sup>) son capaces de detectar antígeno de DVB en la sangre así como en muestras de plasma o suero. Los ELISA NS2-3 pueden ser menos efectivos en terneros jóvenes que tienen una sensibilidad baja y en el calostro debido a la presencia de anticuerpos maternos frente al BVDV. (Goyal, 2005; OIE., 2013)

### **1.6.2 Detección de ácidos nucleicos**

La detección de ácidos nucleicos se puede llevar a cabo a través de la detección de ácidos nucleicos por medio de la reacción de polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) la cual se puede adaptar a la detección de ARN vírico de DVB para fines de diagnóstico, sobre todos si se sospecha de contaminación vírica de bajo nivel. Debido a su alta sensibilidad se considera a la RT-PCR como una alternativa para los actuales métodos de detección de VDVB, especialmente en mezclas de muestras como es el caso de los tanques de leche bronca. Debido a que la secuencia de nucleótidos VDVB es muy variable, es importante seleccionar cuidadosamente y probar los iniciadores (Ridpath *et al.*, 1993). Se ha descubierto que la detección de virus mediante RT-PCR es más sensible y rápida que el aislamiento del virus. Además, al contrario del aislamiento viral, la RT-PCR no se ve afectada por la presencia de anticuerpos en las muestras de suero. Sin embargo, el uso de RT-PCR tiene sus desventajas. Por ejemplo, la prueba no diferencia entre el ácido nucleico del virus vivo o inactivado y puede dar resultados falsos positivos. También es recomendado la realización de una PCR anidada en lugar de una RT-PCR, debido a que la primera se ha encontrado ser hasta 100 veces más sensible que una RT-PCR one step. (Gruber *et al.*, 1994)

### **1.6.3 Detección de anticuerpos**

Se pueden detectar anticuerpos contra el BVDV en sueros de ganado mediante pruebas estándar de neutralización de virus (NV) o mediante ELISA. Desafortunadamente, a menudo es difícil diferenciar entre los anticuerpos

producidos en respuesta a la infección aguda, la vacunación o la transferencia de anticuerpos maternos.

La neutralización del virus (NV), también conocida como suero neutralización (SN), se considera la prueba de patrón oro para la detección de anticuerpos anti-VDVB y se utiliza en todo el mundo. La mayoría de los laboratorios utilizan cepas de VDVB adaptadas al laboratorio muy citopatógenas para pruebas de NV porque facilitan su lectura, aunque en la actualidad hay técnicas de inmunomarcaje que permiten la detección del crecimiento o la neutralización de cepas no citopatógenas cuando se considere deseable.

No es probable que haya ninguna única cepa ideal para todas las circunstancias, pero en la práctica se debería seleccionar una que detecte la mayor proporción de reacciones serológicas en la población local de ganado. Dos cepas citopáticas ampliamente utilizadas son “Oregón C24V” y “NADL”.

La prueba de neutralización que utiliza la cepa tipo 1 del virus no detecta niveles bajos de anticuerpo contra el virus tipo 2 de DVB, y viceversa. En esta prueba, se incuban diluciones dobles seriadas de muestra de suero con una cantidad constante de virus durante 1 hora, acto seguido, se adicionan células indicadoras. La prueba se lee después de 4-5 días de incubación a 37 ° C. La mayor dilución del suero que inhibe los efectos citopáticos inducidos por virus en aproximadamente el 50% de las células inoculadas, se considera el título de anticuerpos del suero.

La prueba puede usarse para la detección de anticuerpos contra BVDV 1 o BVDV 2 según el virus utilizado en la prueba. En la mayoría de las situaciones, las cepas citopáticas de BVDV se usan en la prueba para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes mediante la inhibición de la infectividad viral detectada por la ausencia de citopatología viral. Sin embargo, la prueba también se puede usar con cepas no citopáticas, en cuyo caso la inhibición de la infectividad viral se mide mediante tinción con inmunoperoxidasa de células infectadas. (Goyal, 2005; OIE., 2013)

Para la detección de anticuerpos a través del enzimo-inmuno-ensayo (ELISA) se pueden usar pruebas tanto indirectas como bloqueantes. Los antígenos utilizados en las pruebas de ELISA incluyen antígeno de virus completo, proteínas no estructurales, anticuerpos monoclonales y péptidos. El procedimiento utilizado para preparar el antígeno de virus completo también puede afectar la especificidad y la sensibilidad de la prueba ELISA. La especificidad del serodiagnóstico se ha mejorado en gran medida mediante el uso de anticuerpos monoclonales en sistemas ELISA competitivos, y son posibles mejoras adicionales con el uso de antígenos definidos derivados de técnicas de DNA recombinante. (Goyal, 2005)

Las pruebas más comunes utilizadas en el diagnóstico de DVB son las pruebas ELISA, así como la RT-PCR. En México la entidad encargada de desarrollo de conocimientos científicos y de la innovación tecnológica agropecuaria y forestal como respuesta a las demandas y necesidades de las cadenas agroindustriales y de los diferentes tipos de productores, es el instituto de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias (INIFAP). Esta institución, dentro de sus servicios, oferta el monitoreo de DVB diagnosticándola mediante una ELISA competitiva comercial llamada CIVTEST BOVIS BVD/ BD p80® Hipra, que detecta y cuantifica los anticuerpos específicos contra la proteína p80 (proteína NS3) del VDVB, según las especificaciones del productor.

Cada prueba de ELISA para DVB se ofrece en \$100 MXN + iva (Inifap, 2015), en el caso del diagnóstico a través de RT-PCR, una reacción simple para DVB se valora en aproximadamente \$700 MXN por los servicios del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM; mientras que una RT-PCR múltiple, para 4 patógenos incluyendo VDVB, está en \$1000 MXN (FMVZ, 2017).

### **1.7 Múltiplex – Lúminex**

Existe una técnica diagnóstica que ha estado tomando fuerza desde algunos años, la prueba multiplex por microesferas fluorescentes, lo cual posee la capacidad de analizar múltiples analitos simultáneamente. Esta prueba ofrece varias ventajas sobre las pruebas de analitos individuales tradicionales y se ha convertido en el

método de prueba preferido en muchos laboratorios de investigación y diagnóstico.

Mediante el uso de microesferas teñidas, la tecnología y las plataformas para multiplex permiten a los usuarios detectar y cuantificar rápidamente varios analitos de la misma muestra a un costo menor que las pruebas de analito único y con un excelente rendimiento del ensayo. Las pruebas de este tipo son vendidas en un intervalo de precios que va desde los \$50 -\$100 MXN aproximadamente (Burnham *et al.*, 2013; Hernández-Medrano, 2015).

La configuración de un ensayo consiste en una matriz de suspensión en la que los agentes de captura están covalentemente acoplados a las superficies de las microesferas teñidas internamente. Las reacciones de unión tienen lugar en la superficie de las microesferas que juntas forman una matriz de 100 a 500 miembros, dependiendo de qué analizador Luminex se utilice. Además de los muchos análisis comerciales disponibles para su uso, la arquitectura abierta de esta tecnología permite que los usuarios desarrollen, optimicen y validen rápidamente ensayos personalizados al elegir adherir antígenos o anticuerpos de su preferencia a las microesferas.(Burnham *et al.*, 2013; Bio-Rad, 2016)

Se encuentra entre los ensayos multiplex comerciales uno para el diagnóstico de patógenos gastrointestinales en humanos a partir de material genético en muestras fecales y uno para la detección y medición de citosinas a partir de muestras sanguíneas; ambos diseñados para la captura de antígenos. No se reporta con qué fueron cubiertas las microesferas del primer ensayo, pero el productor asegura que se detectan los ácidos nucleicos de distintos patógenos gastrointestinales; se reporta que las microesferas del segundo ensayo están cubiertas con anticuerpos monoclonales específicos para cada citosina evaluada(Giavedoni, 2005; Wessels *et al.*, 2013).

Como ejemplo de ensayos multiplex de captura de anticuerpos, se puede citar un ensayo para el diagnóstico de tripanosomiasis humana, cuyas microesferas se reportan cubiertas con recombinantes de distintas proteínas con valor antigénico

del protozooario y un ensayo para el diagnóstico del complejo respiratorio bovino, cuyas microesferas tienen adheridas proteínas virales purificadas de los distintos agentes infecciosos. (Anderson *et al.*, 2011; Muuo *et al.*, 2016).

Por ende, se puede sugerir que las pruebas diagnósticas tipo multiplex son una mejor alternativa y de bajo costo al intentar realizar un método diagnóstico para varios antígenos a la vez, como en el caso de los complejos.



## 2 JUSTIFICACIÓN

En México existen tasas de seroprevalencia de DVB mayores al 90% en zonas del país, el diagnóstico de dicha enfermedad se realiza con pruebas tipo ELISA que están diseñadas para otros países por lo que podríamos tener un porcentaje de falsos negativos, en el presente trabajo se propone identificar al menos una proteína inmunodominante a partir de cepas de diferentes genotipos que garanticen un diagnóstico certero de animales infectados con el VDVB, que en un futuro, servirá en el diseño de un método diagnóstico tipo lúminex para enfermedades abortivas, la cual a su vez podrá apoyar en la estimación de la prevalencia de dichas patologías.

### **3 HIPÓTESIS**

Las cepas de los genotipos 1 y 2 de VDVB contienen proteínas inmunodominantes conservadas que serán reconocidas por bovinos infectados, no vacunados, de diferentes regiones del país.

### **4 OBEJTIVO GENERAL**

Identificar una proteína inmunodominante del virus de Diarrea Viral Bovina genotipos 1 y 2 mediante western blot para utilizarla en el diagnóstico serológico de la enfermedad en bovinos del país.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Expandir cepas DVB ATCC (NADL, NY-1) y silvestre mediante propagación en cultivo celular para generar material para RT-PCR y WB.

Enfrentar cepas de VDVB mediante WB a suero control y sueros de campo para identificar proteínas inmunodominantes.

Aislar proteína inmunodominante en común reconocida en las cepas de VDVB mediante comparación de WBs para su posterior secuenciación.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Virus y líneas celulares

Se utilizaron las cepas del Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB) NADL (VDVB-1a, citopático, ATCC VR-1422), New York (VDVB-1b, no citopático, ATCC VR-1561) y una cepa de aislamiento nacional por el Dr. Ángel Retana de la FMVZ nombrada DVB2 (VDVB-2, no citopático) en cultivo celular de la línea Mardin Darby Bovine Kidney (MDBK)

### 5.2 Crecimiento y mantenimiento de la línea celular MDBK (Mardin Darby Bovine Kidney)

Se descongeló un criotubo de células MDBK a 4°C, posteriormente dicho criotubo se centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5417R) a 2300 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, se eliminó sobrenadante. El botón celular obtenido se resuspendió en 1 ml de medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, [Gibco] Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) al 10% de suero fetal bovino (SFB, [Gibco] Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) irradiado y adicionado con HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, SIGMA-ALDRICH, San Luis, EUA) a 25 mM. El botón resuspendido fue agregado con una pipeta serológica, en un gabinete de bioseguridad nivel 2 (NUAIRE Biological safety cabinet class II type A/B), a una botella de 25 cm<sup>2</sup> (NEST 707001) que contenía 2 ml de medio de crecimiento, las células fueron mantenidas a 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y humedad constante.

Las células fueron cosechadas con Tripsina al 0.25% EDTA (Gibco, Canadá) y se dejó incubando a 37°C hasta que se desprendieron las células y la suspensión fue cuantificada con un hemocitómetro Neubauer. La viabilidad fue calculada con azul de tripán en una reacción 1:1. A partir de esto se realizó un banco de células en criopreservación para su uso dentro del estudio. Las células se congelaron en crioviales a -70°C con medio de congelación Synth-a-Freeze ([Gibco] Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) a concentración de 4,000,000 de células por ml.

### 5.3 Propagación Viral

Se hizo uso de células MDBK con 90% de confluencia para infectarlas con las distintas cepas virales, para la cepa NADL se utilizó un lote de virus previamente expandido con título de  $10^{6.9}$  DICC 50%, para la cepa NY se siguieron las recomendaciones del productor y para la cepa DVB2 se empleó un lote del aislado original de la cepa, todas se suspendieron DMEM al 2% SFB, se dejó en agitación lenta (Mini mixer, Selecto Bioproducts, SBS600) a temperatura ambiente durante 40 minutos.

El medio de infección con el inóculo fue eliminado y se reemplazó por DMEM 2% SFB en cada botella. Se incubaron a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y observadas al microscopio a las 24, 48, 72 y 96 horas postinfección (p.i) para registrar efectos citopáticos. Se utilizó como control negativo una botella de 25 cm<sup>2</sup> con células sin infectar, las cuales fueron sometidas al mismo protocolo. Dado que dos cepas son no citopáticas, los cambios morfológicos de la cepa citopática fungieron como control positivo.

Se cosecharon las células al observar efectos citopáticos en los cultivos con NADL a las 96 horas p.i; estas fueron procesadas para la extracción de RNA total o para su uso en Western Blots (WBs).

## 5.4 Western Blot

Para obtención de partículas virales, se retiró el sobrenadante de una botella infectada de 25 cm<sup>2</sup>, este puede ser guardado o eliminado, a la monocapa se le cubrió con 200 microlitros de Tritón al 1% (Tritón X100, SIGMA-ALDRICH, San Luis, EUA, T8787) la cual fue almacenada por separado.

Como control negativo se utilizó una suspensión de células MDBK lisadas; para obtener dicho control, se escogió una botella de 25 cm<sup>2</sup> que tuviera una confluencia entre 80 - 100%, se eliminó el medio de crecimiento y se lavó la monocapa, sin despegarla, con PBS 1X dejando 1 ml de PBS 1x limpio cubriéndola, posteriormente se sometió a las células a 10 ciclos de congelación-descongelación.

La cuantificación de proteína se llevó a cabo mediante el protocolo de Bradford (Bio-Rad, California, EUA) en celdas de plástico de 1 ml (Bio-Rad, 223-9955) con una curva tipo con concentraciones de 2- 10 µg/µl con incrementos de 2 µg/µl de albúmina sérica bovina cuantificada (BSA, de 2 mg/ml,). Las absorbancias fueron leídas en un espectrofotómetro (Biotech Ultrospec 3000) a una longitud de onda de 595 nm. Un ejemplo de los ejercicios realizados se puede observar en la Figura 4.

Las proteínas fueron resueltas en geles SDS-PAGE al 8%, los pozos para la resolución de la proteínas virales se cargaron al tope con la suspensión obtenida del lisado del cultivo de cajas a 96 horas p.i con 90% de confluencia de cada una de las cepas expandidas, se utilizó como control de peso molecular (MW) Precision Plus Protein Dual Color Standards (Figura 5, Bio-Rad, California, EUA, 1610374) y como control negativo se cargaron 10 µg de células MDBK lisadas.

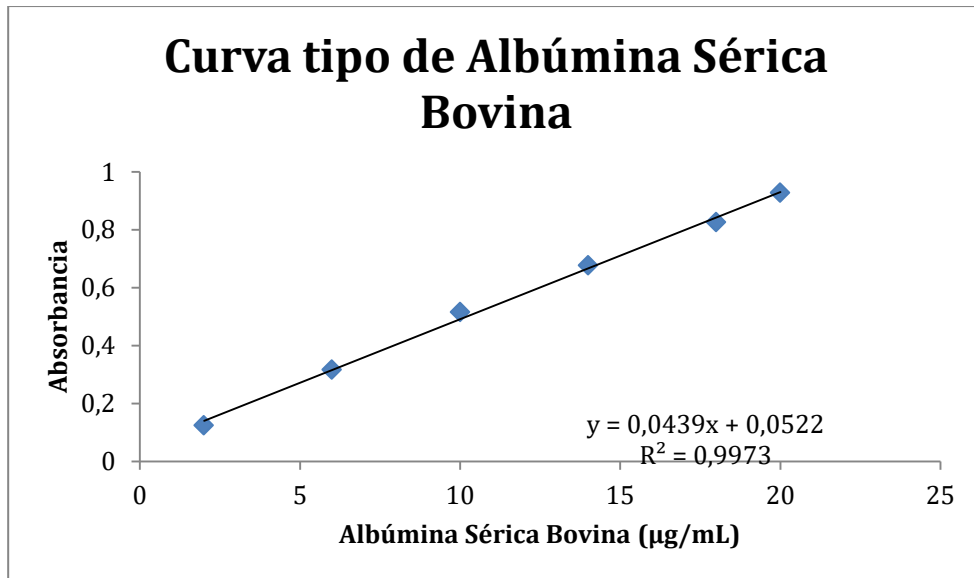


Figura 4. Ejemplo de gráfica de curva tipo de BSA para la cuantificación de proteína de MDBK sin infectar

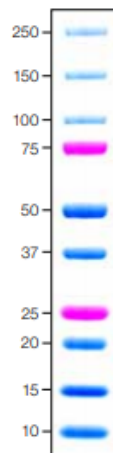


Figura 5. Representación de un lote de Precision Plus Protein Dual Color Standards

Subsecuentemente se realizó la transferencia húmeda, a 100V constantes durante 75 minutos, de las proteínas virales y celulares a una membrana Polivinildifluoruro (PVDF, Immobilon-P, Merck Millipore, Massachusetts, Estados Unidos, IPVH00010), la cual posteriormente es teñida con rojo de Ponceau (SIGMA-

ALDRICH, San Luis, EUA,18137) para evidenciar la presencia de proteína en la membrana.

Las membranas transferidas se bloquearon en una solución al 2% del agente bloqueador “ECL™ Advance Blocking Reagent” ([GE Healthcare, RPN418] SIGMA-ALDRICH, San Luis, EUA, GERPN418). Posteriormente, se emplearon los siguientes anticuerpos primarios, también se muestra la dilución en la que fueron usados:

- Suero hiperinmune comercial policlonal específico contra DVB (VMRD, Washington, USA) dilución 1:1000
- Sueros positivos a DVB de animales no vacunados en el estado de Guerrero (2 grupos de 12 animales distintos cada uno, donación del Banco de Sueros, FMVZ-UNAM) dilución 1:300 \*
- Sueros positivos a DVB de animales no vacunados en los estados de Zacatecas, Durango, Tamaulipas, Veracruz y Chiapas (5 grupos de 12 animales distintos cada uno, donación del Banco de Sueros, FMVZ-UNAM) dilución 1:1000\*

\*Todos los sueros de campo utilizados son positivos a la prueba ELISA (IDEXX BVDV Total Ab Test, Maine EUA)

Las membranas se lavaron con PBS 1x 3 veces, 10 minutos por vez, antes de incubar con una solución de agente bloqueador al 1% y anticuerpo secundario en una dilución 1:100 000 (rabbit anti bovine- IgG, donación del Banco de Sueros, FMVZ-UNAM) durante 1 hora en agitación lenta a temperatura ambiente

La reacción fue revelada con el reactivo “Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate” (Merck Millipore, Massachusetts, Estados Unidos, WBLUR0100) y el fotodocumentador para quimioluminiscencia MicroChemi 4.2.

## 5.5 Extracción de RNA y PCR

Para la extracción de RNA se empleó el protocolo para células adheridas del kit de extracción de RNA total "Quick-RNA™ MiniPrep" (Zymo Research, California, EUA, R1054 & R1055), con las siguientes adaptaciones, buffer de lisis a 500 µl para una botella de 25 cm<sup>2</sup>, las centrifugaciones a 1 minuto y el volumen de elución a 50 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas. Las extracciones fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (NanoDrop, ND-1000) inmediatamente después de terminar el protocolo de extracción y se mantuvieron a -70°C hasta el momento de realizar la RT-PCR.

La RT-PCR se realizó usando el kit One Step RNA PCR Kit (AMV) (Takara; Hoffmann-La Roche, Japón; Suiza, RR024A) se siguió el protocolo del kit.

Los iniciadores usados en las reacciones de RT-PCR fueron los siguientes **FWD** GCTAGCCATGCCCTTAGTAGGACTAGC y **RVS** AACTCCATGTGCCATGTACAGCAGAG (López, 2014) están dirigidos a la fracción conservada 5'UTR, la cual es utilizada para diagnóstico; otros iniciadores fueron **FWD** AAGCTTCCATAATGCTAATAACAGGGGCAC y **RVS** CTAACCCATAGCCATCTGCTCAG (Couvreur *et al.*, 2007) los cuales amplifican la sección correspondiente a la proteína E2 en un VDVB del genotipo 2. En el Cuadro 2 se enuncian las secuencias de los iniciadores, así como la fracción a la que están dirigidos y el tamaño del producto obtenido.

Las reacciones se realizaron bajo los parámetros que se pueden ver en el Cuadro 3. Los amplicones fueron observados en geles de agarosa al 1.8%. Se agregó el marcador de peso "GeneRuler 1kb DNA Ladder" (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA, SM0312) para cada gel de agarosa (Figura 6).

El producto obtenido con los oligonucleótidos para la región de E2 fue purificado con el protocolo para microcentrífuga del "QIAquick Gel Extraction kit" (Qiagen, Hilden, Alemania, 28706)



Cuadro 2. Secuencias y tamaño de fragmentos esperados para los iniciadores específicos de VDVB			
Nombre	Secuencia	Región	Producto esperado (pb)
5'UTR (López, 2014)	FWD GCTAGCCATGCCCTTAGTAGGACTAGC RVS AACTCCATGTGCCATGTACAGCAGAG	5'UTR	293
E2 (Couvreur <i>et al.</i> , 2007)	FWD AAGCTTCCATAATGCTAATAACAGGGGCAC RVS CTAACCCATAGCCATCTGCTCAG	7-9 últimos residuos de C-terminal de E1, sitio de escisión de E1-E2, toda E2 hasta sitio de escisión con p7	1139

GeneRuler 1 kb DNA Ladder

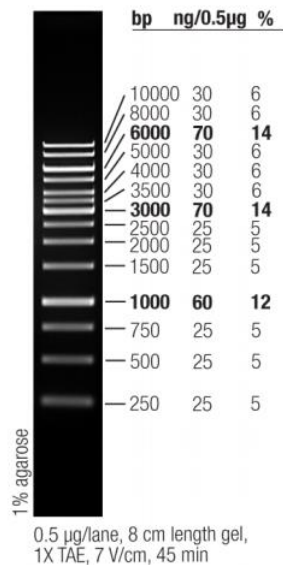


Figura 6. Representación del control de pares de bases GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA, SM0312.

Cuadro 3. Parámetros específicos para cada tipo de oligonucleótido empleado.	
Parámetros para 5'UTR	Parámetros para E2*
1. 50°C 30 minutos	1. 50°C 30 minutos
2. 94°C 15 minutos	2. 94°C 2 minutos
3. 94°C 30 segundos 4. 56°C 30 segundos 5. 72°C 1 minuto	3. 94°C 30 segundos 4. 51°C 1 minuto 5. 72°C 2 minutos
6. 72°C 10 minutos	6. 72°C 7 minutos
7. Se mantiene a 4°C	7. Se mantiene a 4°C

\* Se tomaron como referencia los parámetros publicados por Couvreur et al (2007).

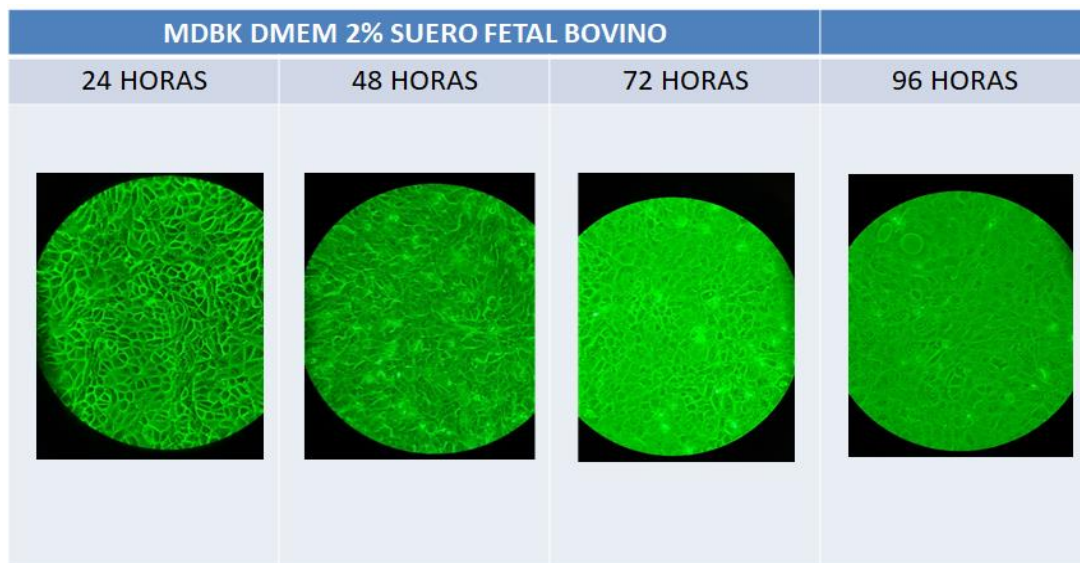
### 5.6 Secuenciación del producto amplificado con los iniciadores específicos para la glicoproteína E2

Los productos de la RT-PCR fueron secuenciados en ambos sentidos con el equipo 3500xL Genetic Analyzer de Thermo Fisher Scientific dentro de las instalaciones de Instituto de Biotecnología, UNAM (IBT). Para ello se utilizaron los mismos oligonucleótidos que se emplearon en la RT-PCR para la región de la glicoproteína E2 (100 ng de producto amplificado y 10 pmol de cada oligonucleótido). La secuencia obtenida se analizó en el programa computacional BioEdit sequence alignment editor, la cual fue sometida a la base de datos del GenBank, para buscar homologías en la plataforma “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Validación del Modelo

Antes de comenzar con los experimentos, se verificó que las células utilizadas como control negativo y para las infecciones virales fueran libres de DVB, para eso, las células fueron descongeladas y expandidas, estas fueron sometidas al protocolo de infección y se mantuvieron en observación durante 96 horas, con el fin de evidenciar si ocurrían cambios morfológicos en la monocapa. Posteriormente, al cultivo se le extrajo RNA total el cual fue sometido a una RT-PCR diagnóstica (iniciadores específicos para la región 5'UTR), para asegurarse de que no había presencia de RNA viral. El resultado de la reacción, así como fotografías del monitoreo de la morfología en la monocapa de las MDBK se muestran en la Figura 7.



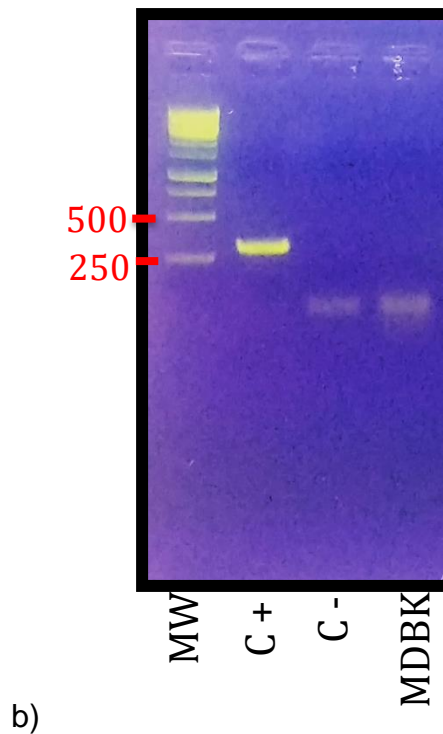


Figura 7 a) Cultivo de MDBK a 24, 48, 72 y 96 horas luego de haber agregado medio DMEM 2% SFB, b) productos de la RT-PCR (Gel agarosa 1.8%) con iniciadores específicos contra fracción 5'UTR de 293 pb.. MW: 1 Kb Plus (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), C+: Vacuna Bovimune 5 (Lapisa, La piedad, México), C-: PBS.

## 7.2 Expansión de Cepas Virales

Siguiendo el protocolo de infección, se inocularon células MDBK con las cepas NADL- citopática  $10^{6.9}$  DICC 50%, New York no citopática ATCC VR 1561 siguiendo las recomendaciones del productor (1 mL para una botella de 25 cm<sup>2</sup> provee una MOI 0.1) y una cepa de campo local (genotipo 2). Los cultivos fueron monitoreados diariamente con el fin de vigilar la integridad de la monocapa e identificar efectos citopáticos. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 8, para la cepa NADL se evidenciaron zonas sugerentes a lisis celular desde las 72 horas p.i, para las cepas NY y DVB2 no se pudieron apreciar cambios morfológicos.

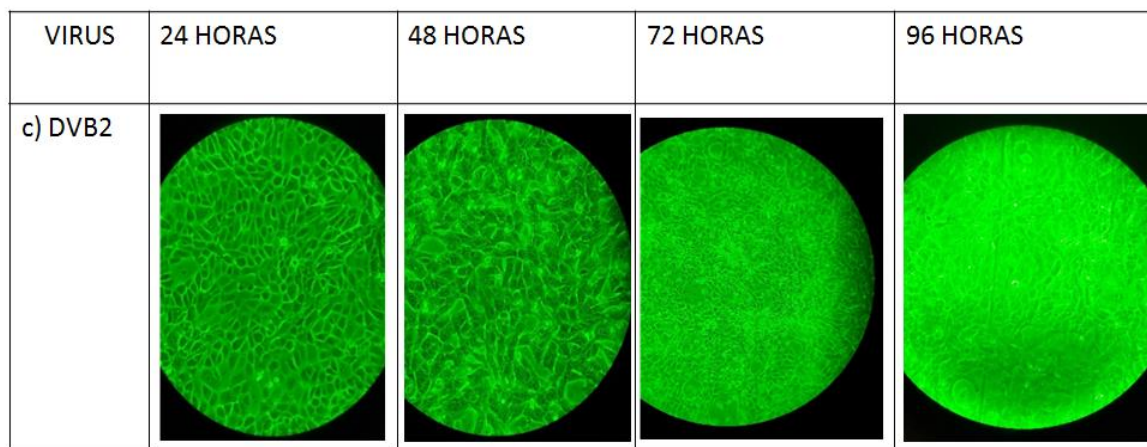
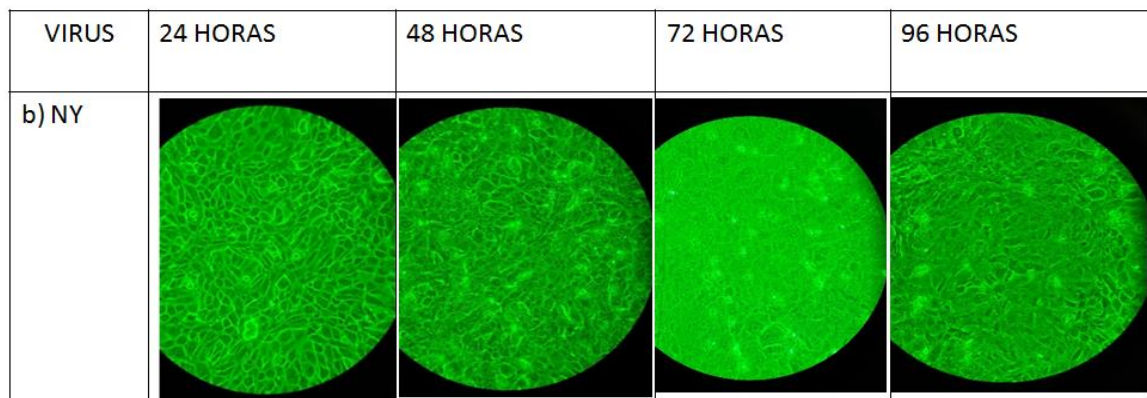
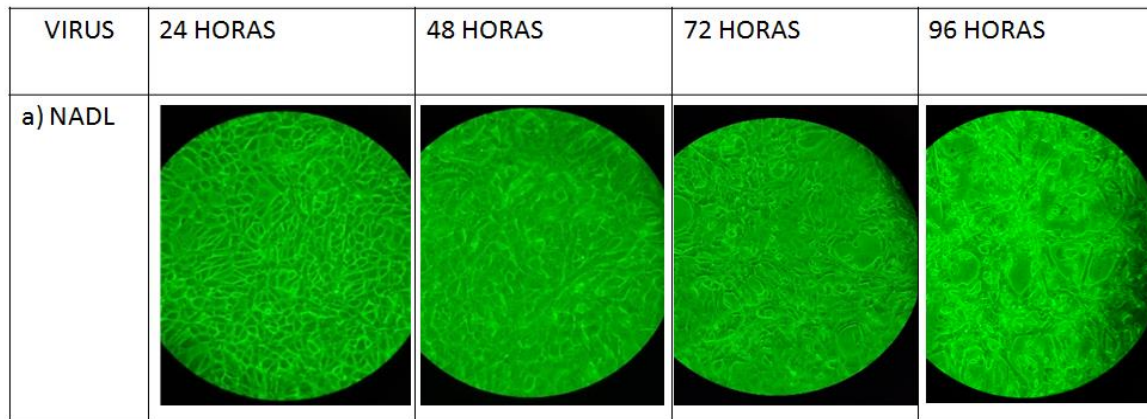


Figura 8 Cultivo en medio DMEM con suero fetal bovino al 2% a 24, 48, 72 y 96 horas después de infección con las cepas a) NADL. b) New York c) Cepa de campo (aislado nacional; DVB2). Para la cepa NADL se observan zonas sugerentes a lisis células desde las 72 horas p.i.

Debido a que no se pueden observar cambios morfológicos en las cepas no citopáticas, éstas fueron cultivadas a la par de la cepa citopática manteniendo las mismas condiciones para todas, fueron cosechadas a las 96 horas p.i. cuando los cambios morfológicos en la monocapa de NADL eran evidentes, se les extrajo RNA total y fueron sometidas posteriormente a una RT-PCR contra la sección conservada de 5'UTR del VDVB. En la Figura 9 se muestra la obtención de amplicones mayores a 200 pb en el control positivo, NADL, cepa de campo (DVB2) y New York (NY), sugerentes al producto esperado de 293 pb.

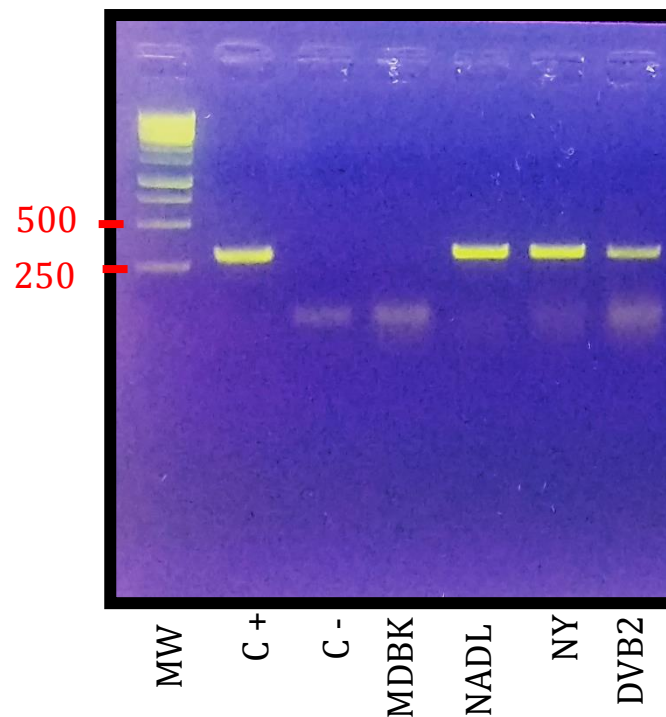


Figura 9. RT- PCR contra la fracción 5'UTR de 293 pb. Gel agarosa 1.8%. MW GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA, SM0312), C+: Vacuna Bovimune 5 (Lapisa, La piedra, México), C-: PBS

### 7.3 Reconocimiento de cepas virales por sueros

Una vez que se lograron establecer los cultivos y se expandieron las diferentes cepas virales, fueron realizados ensayos de Western Blot (WB) para identificar las proteínas inmunodominantes. Las proteínas totales provenientes de cultivos celulares con y sin infectar con las cepas NADL, NY y DVB2 fueron resueltas en geles SDS-PAGE al 8% y enfrentadas a un suero positivo hiperinmune policlonal específico contra DVB (VMRD, Washington, USA) que nombramos como “control”, en la Figura 10 se observa los resultados obtenidos. El enfrentamiento de la cepa NADL con el suero control reveló 5 bandas francas, mientras que los enfrentamientos de las cepas NY y DVB2 no mostraron banda alguna

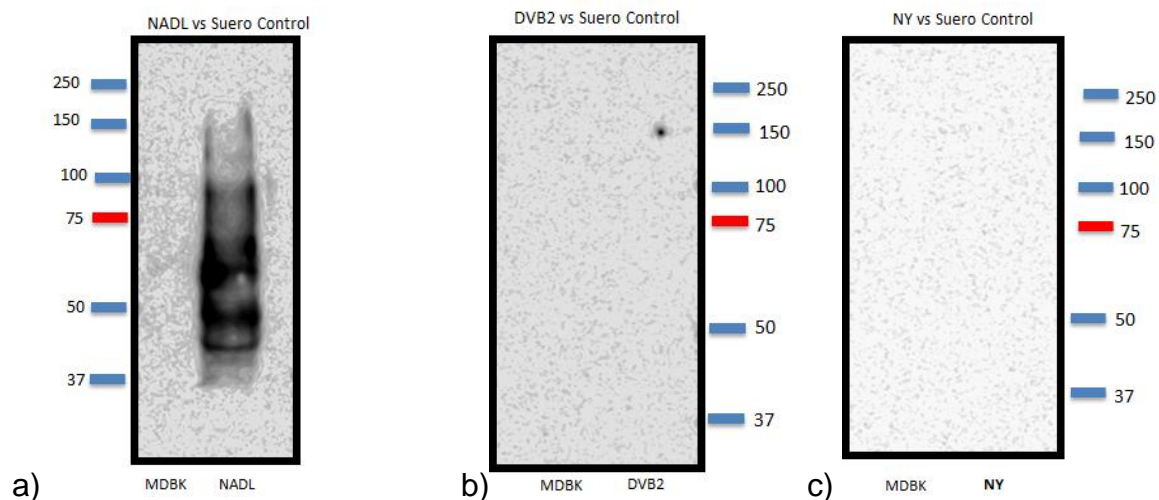


Figura 10 Western blots de diferentes cepas del VDV-B incubados con suero positivo comercial contra VDV-B: a) Cepa NADL; b) Cepa de Campo (DVB2) y c) Cepa New York.

#### 7.3.1 Enfrentamiento de cepas virales a sueros del estado de Guerrero

Debido a que el suero comercial sólo identificó a la cepa NADL y no al aislado nacional o bien de la cepa New York, se realizó una serie de WBs con las tres cepas virales (NADL, NY y DVB2) enfrentadas a 2 grupos de suero de animales infectados naturalmente (no vacunados) procedentes del estado de Guerrero y positivos a la prueba ELISA contra DVB (12 animales por grupo, donación del Banco de Sueros, FMVZ-UNAM). En este caso, los sueros no reconocen proteínas

de la cepa NADL, sin embargo, se observan 6 bandas de reconocimiento en el grupo 1 (Pool 1) y 5 bandas en el grupo 2 (Pool 4) al ser enfrentados a la cepa DVB2, mientras que al ser enfrentados a la cepa NY el grupo 1 muestra 6 bandas y el grupo 2 sólo una banda franca. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11.

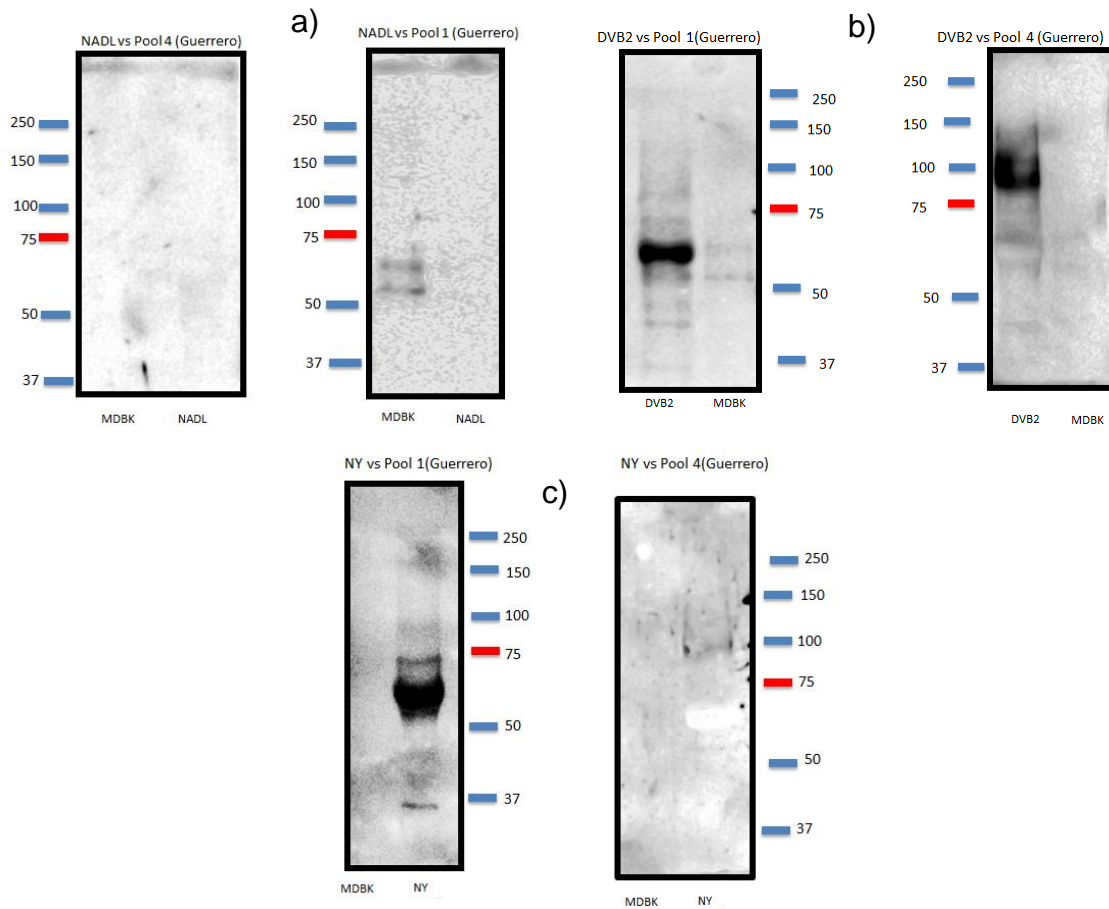
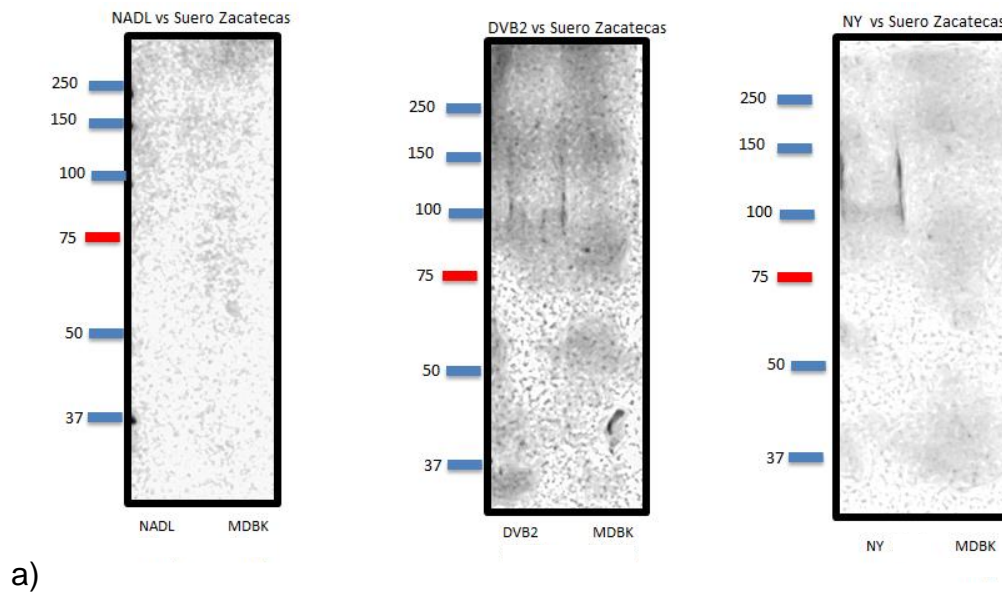


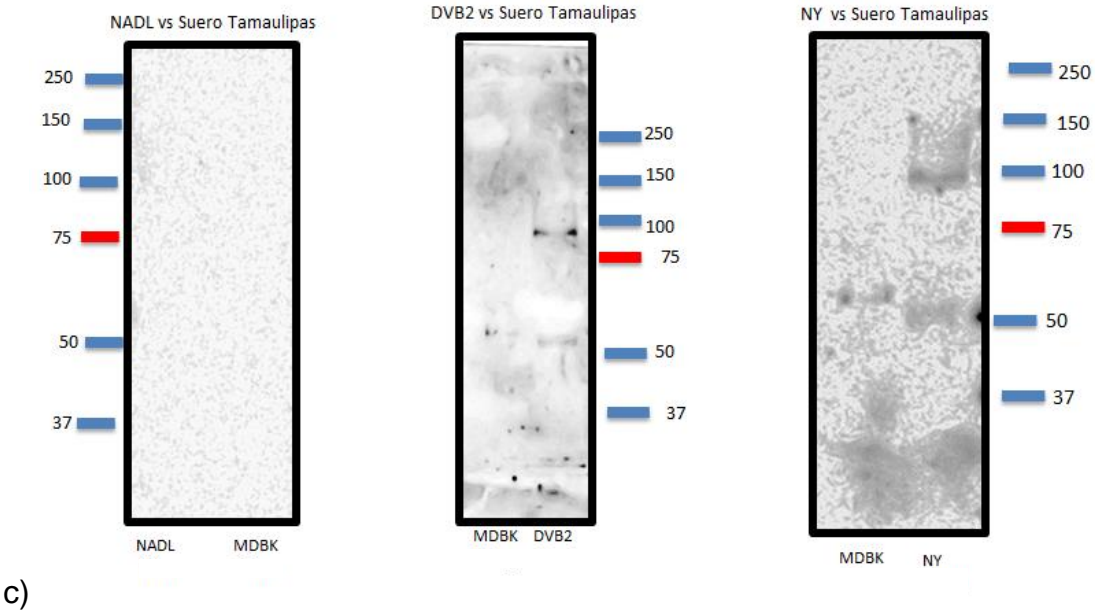
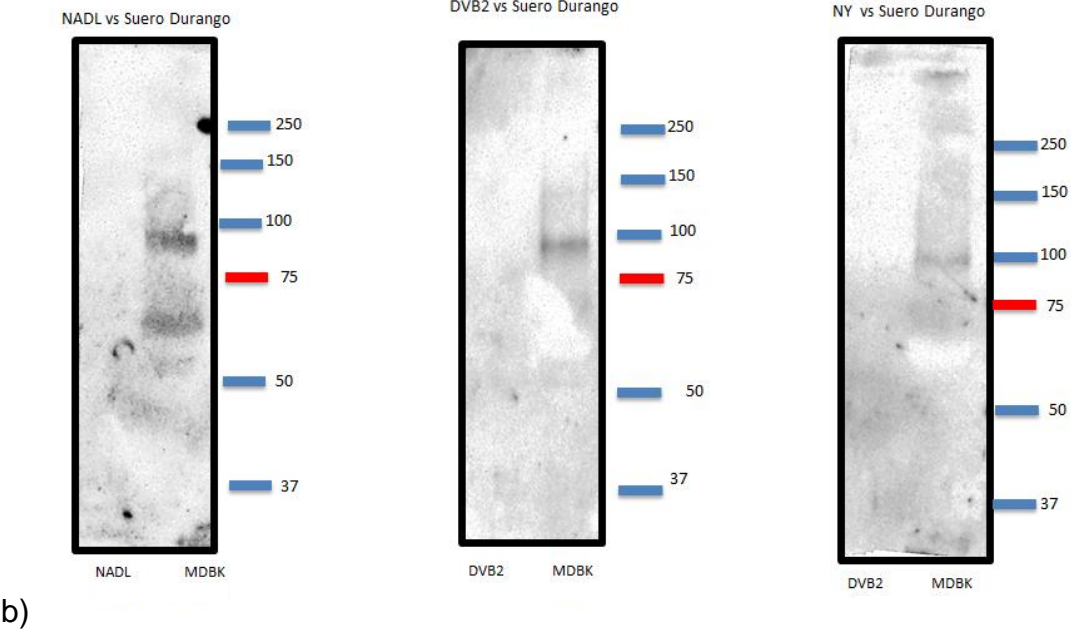
Figura 11 Western blots de las diferentes cepas del VDV B incubados con dos grupos de sueros positivos contra DVB de animales no vacunados del Estado de Guerrero. a) cepa NADL; b) cepa de campo (DVB2); y, c) Cepa Nueva York.



### 7.3.2 Evaluación de las diferentes cepas virales expuestas a sueros de diferentes estados

Una vez que se observó que el patrón de reconocimiento del suero control y los sueros de campo eran distintos, para demostrar que la tendencia en la respuesta de reconocimiento de las cepas virales no es específica del estado de Guerrero, se realizaron WBs con grupos de sueros positivos contra DVB obtenidos de animales no vacunados provenientes de zonas con ganado en pastoreo y con prevalencias mayores al 60%, tal es el caso de: Zacatecas, Durango, Tamaulipas, Veracruz y Chiapas. En la Figura 12 se muestra el patrón de reconocimiento de cada grupo a las proteínas de las 3 cepas virales.





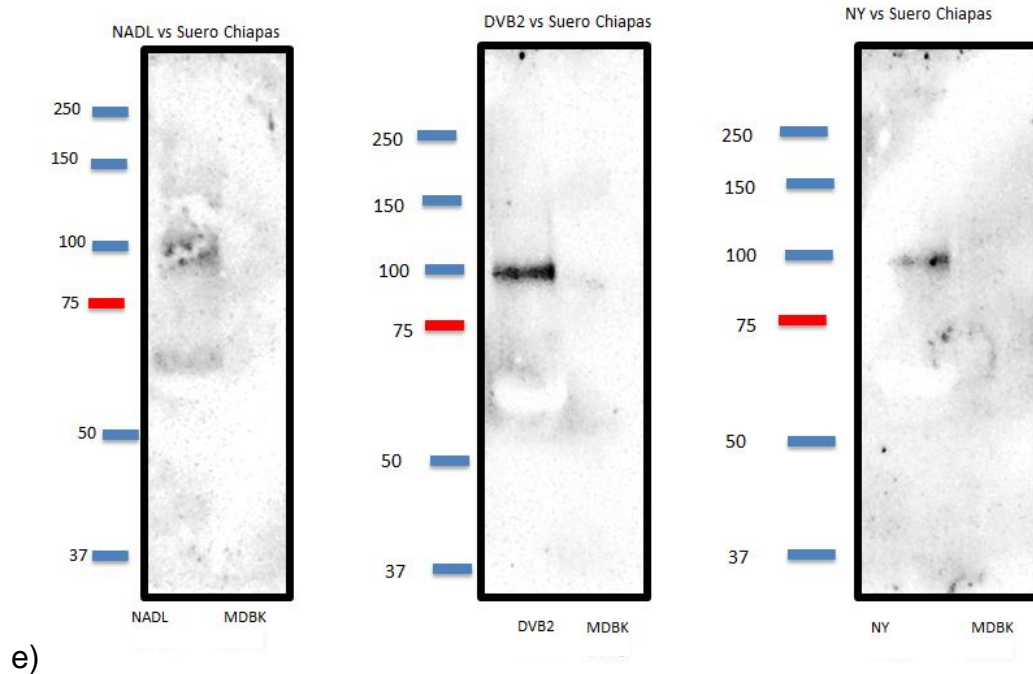
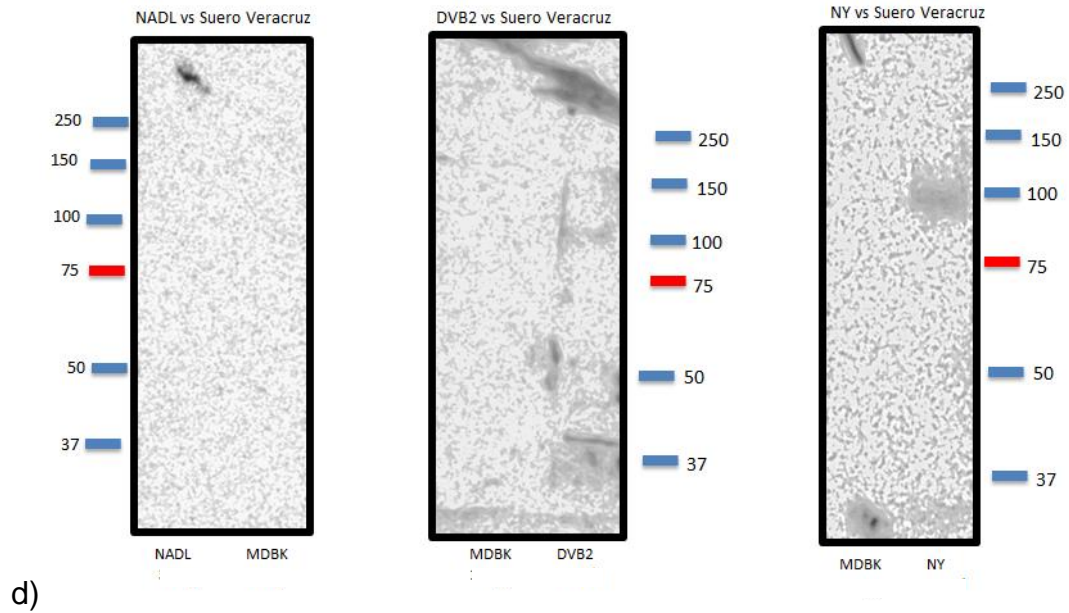


Figura 12 Western blots de cepas de NADL, DVB2 y New York contra un grupo de sueros de 5 distintos estados: a) Chiapas, b) Durango, c) Tamaulipas, d) Veracruz y e) Zacatecas. Las proteínas fueron resueltas como se indica en la metodología.

## 7.4 Esquematización de reconocimiento de bandas

Debido a la diversidad de los resultados obtenidos, se realizó una esquematización virtual de las bandas reconocidas por los distintos grupos de sueros según su migración relativa. Estas fueron comparadas con un patrón en el que se muestran todas las proteínas virales (Figura 13 – segunda columna de izquierda a derecha) ordenadas según su peso molecular (lista presentada en el cuadro de la extrema derecha obtenidos de Ridpath, 2010). El suero control únicamente fue capaz de reconocer a la cepa NADL mientras que únicamente el 29% de los sueros de campo reaccionaron al ser enfrentados a ella, en contraparte, el 100% de los sueros mencionados respondieron ante las cepas NY y DVB2. Se observan bandas que se presentan de forma relativamente constante entre a las marcas de 75 KDa y 50 KDa del control de peso molecular, así como bandas entre las marcas de 100 KDa y 150 KDa. En promedio los WB reactivos a NADL reconocieron 4.3 bandas, los de DVB2 3.14 y los de NY reconocieron 1.8 bandas.

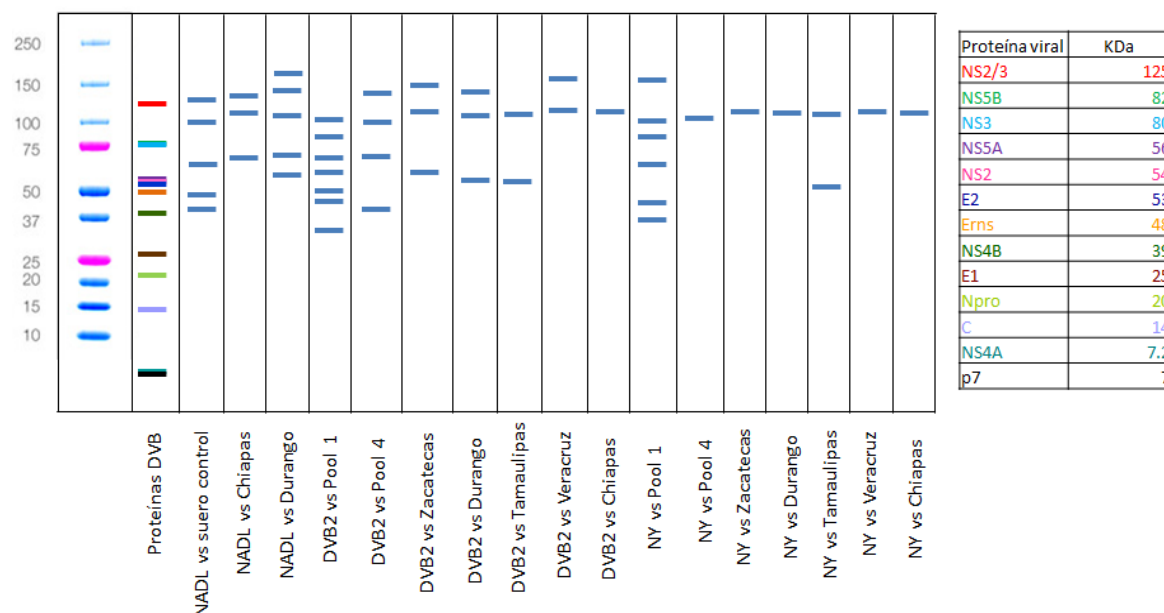


Figura 13 Comparación esquemática de las bandas obtenidas en los WBs empleando un patrón virtual de referencia de todas las proteínas virales (carril 2 y cuadro derecha). Los grupos de sueros positivos de diferentes estados (Chiapas, Durango, Guerrero (Pool 1 y 4), Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas) incubados con las diferentes cepas del VDVB (NADL, cepa de campo (DVB2) y Nueva York).

## 7.5 Amplificación del gen que codifica para E2

Al observar la heterogenicidad del reconocimiento por los sueros de campo, se decidió amplificar el gen de una proteína inmunodominante reconocida por los mismos sueros. La proteína candidata fue la glicoproteína E2, se utilizaron indicadores descritos previamente en la literatura que reportan un producto de 1139 pb. En la figura 14 se muestra el resultado, se puede observar una banda superior a 1000 pb tanto en el carril del control positivo como en el carril de la cepa New York (NY), sugiriendo la presencia del producto esperado.

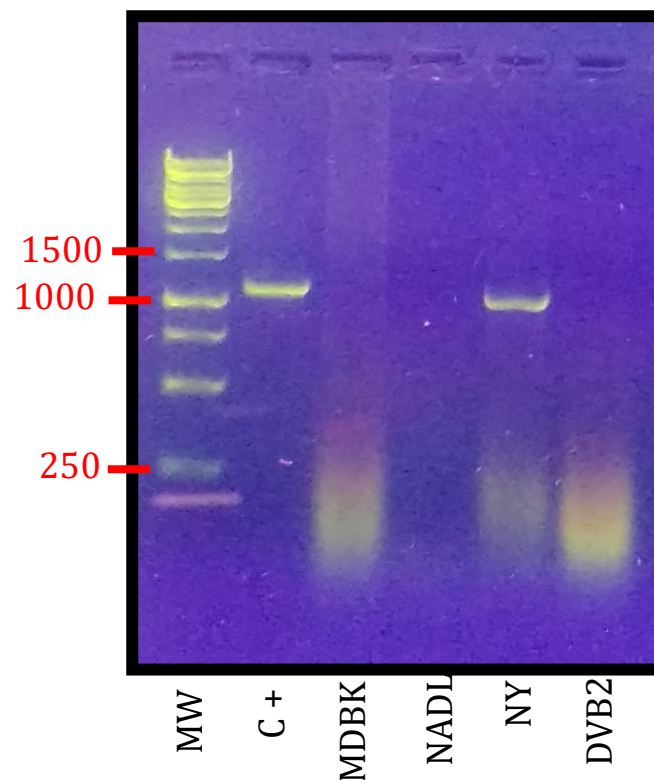


Figura 14. RT-PCR con iniciadores específicos para E2. (Agarosa 1.8%) MW: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA, SM0312), C+: Vacuna Bovimune 5 (Lapisa, La piedra, México)

La única cepa que mostró haber amplificado la región de E2 fue la New York (los experimentos fueron realizados por quintuplicado). Posteriormente, el amplicón fue purificado a partir del gel y secuenciado. En la Figura 15 se aprecia el resultado de la reacción con las distintas extracciones de la cepa New York y en la Figura 16 el resultado de la purificación de las bandas del gel en la Figura 15. Se cortó la zona donde se encontraban las bandas amplificadas de E2 en las reacciones de la cepa New York de la reacción pasada y con el protocolo de extracción de gel del QIAquick Gel Extraction kit se purificaron dichas bandas; como prueba de correcta purificación observamos la presencia de una sola banda superior a 1000 pb.

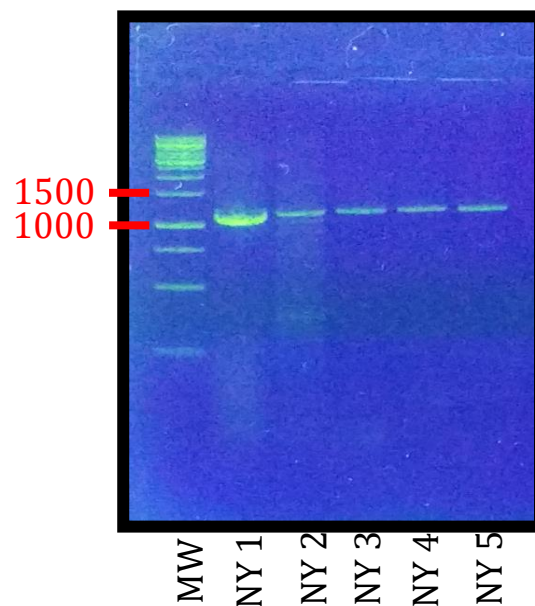


Figura 15 RT-PCR de E2. Gel agarosa 1.8%. Se muestran 5 distintas extracciones de la cepa New York. Se evidencia la presencia de una banda mayor a 1000 pb en todos los carriles. MW: GeneRuler 1kb DNA Ladder.

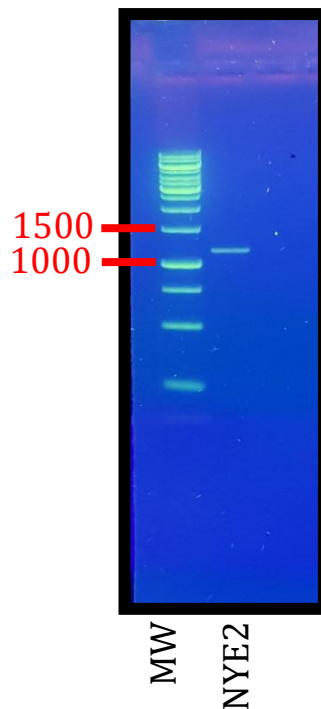


Figura 16. Purificación del amplicón de 1139 pb. Gel agarosa 1.8. MW: GeneRuler 1kb DNA Ladder.

### 7.8 Secuenciación de producto amplificado con iniciadores específicos para E2

El fragmento purificado fue secuenciado. Los datos obtenidos fueron sometidos a la plataforma BLAST para la búsqueda de homologías con las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI. Este análisis reveló una identidad del 92% con la secuencia de la glicoproteína E2 de varios aislamientos del VDVB-2 dentro del GenBank.

Posteriormente se realizó un alineamiento empleando la misma plataforma BLAST, para comparar la secuencia obtenida con la secuencia específica de VDVB-1-NADL previamente reportada (Número de acceso del NCBI: NC\_001461.1). El resultado de dicho alineamiento no mostró similitud alguna, lo que indica que las secuencias de las glicoproteínas E2 de ambas cepas son totalmente distintas

## 8 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las pruebas de western blot (Figuras 10, 11, 12) demuestran una variabilidad antigénica entre las cepas NADL, NY y DVB2. Lo anterior puede ser debido a diferencias genómicas que han sido reportadas con anterioridad por distintas publicaciones (Fulton *et al.*, 2005; Ridpath, 2005, 2008, 2010; Peterhans *et al.*, 2010).

La naturaleza genómica de los virus RNA les confiere plasticidad y adaptabilidad a variaciones en el medio debido a las frecuentes mutaciones que estos sufren. Se estima un intervalo de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  sustituciones por nucleótido y por ronda de copiado durante la replicación y retrotranscripción del RNA; así mismo se considera que la recombinación molecular es un proceso muy activo, sobretodo en virus de RNA en sentido positivo (Domingo & Holland, 1997). En el caso del virus de la Hepatitis C, otro miembro de la familia *Flaviviridae*, existe la evasión de la inmunidad adaptativa del hospedero debido a mutaciones en el mismo; estas mutaciones suelen ocurrir en los epítomos reconocidos por el complejo de histocompatibilidad I o II, lo cual impide la presentación o el correcto procesamiento del antígeno; de la misma manera, ocurren varias sustituciones, probablemente de forma simultánea, en diversos epítomos del receptor de células T, lo que previene el reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos. (Burke & Cox, 2010). Durante la segregación del VDVB en dos genotipos, se pudieron demostrar diferencias antigénicas entre ambos, ya que los títulos de anticuerpos neutralizantes que se encuentran en los sueros de animales convalecientes suelen ser varias veces más altos contra virus del mismo genotipo, además de que el patrón de unión de anticuerpos monoclonales difieren entre uno y otro; dichas variaciones en la antigenicidad también han sido descubiertas entre subgenotipos según lo demuestran diferencias en pruebas neutralización cruzada, unión de anticuerpos monoclonales y respuesta de animales PI (Ridpath, 2010).



Existe un estudio en México que se dedicó a genotipificar y subgenotipificar las cepas de VDVB presentes en los estados de Veracruz, Tamaulipas, Querétaro, Morelos y Chihuahua, obteniendo como resultado predominancia de las cepas BVDV-1c, seguida por BVDV-1b, BVDV-1a y BVDV-2a en orden descendente (Gómez-Romero *et al.*, 2017). En cambio, en Estados Unidos, el genotipo predominante es BVDV-1b, seguido por BVDV-1a y BVDV-2 (Workman *et al.*, 2016). Las muestras de suero evaluadas en este estudio dieron una tendencia de reconocimiento inclinada hacia las cepas NY y DVB2, ya que 5 de los 7 grupos evaluados, correspondientes al 71%, reconocieron únicamente a dichas cepas (Figura 13). Esto difiere con los resultados publicados por Gómez-Romero *et al.* en el 2017, ya que la cepa NY utilizada en este trabajo pertenece al subtipo 1b y la cepa DVB2 al genotipo 2. Ninguna de las cepas pertenece al subtipo reportado como predominante, sin embargo, ambas fueron reconocidas en todos los sueros de campo evaluados. Aun así, es arriesgado generalizar y decir que los resultados de antigenicidad obtenidos en este estudio son aplicables a nivel nacional, dado que la cantidad de muestras con la que se trabajó no es representativo del total del país.

Según el esquema de bandas obtenidas, presentada en la Figura 13, la banda más constante es una que aparece dentro del intervalo de 70-110 KDa, todas se pueden considerar cercanas a los 80 KDa, peso aproximado de la proteína NS3; esta banda aparece en el 70% de los western blot realizados. Según publicaciones, la proteína NS3 es específica de cepas citopáticas (Ridpath, 2005, 2010; Tautz *et al.*, 2015), aun así, una banda sugerente a la misma puede observarse en WB de las cepas NY y DVB2. Lackner *et al.* en el año 2004 mencionaron que puede encontrarse NS3 escindida en cepas no citopáticas durante las primeras 6 a 9 horas pos infección, posteriormente, Kameyama *et al.* en el año 2008 pudieron demostrar la presencia de NS3 en leucocitos y tejido de animales persistentemente infectados, encontrando altas concentraciones de esta en leucocitos, tiroides, pulmón y linfonodos, especialmente linfonodos intestinales. Es necesario continuar con pruebas de identificación de la banda en cuestión para asegurarse de que se trata de NS3, ya que llama la atención que en el caso de

aproximadamente el 43% de los WB de cepas no citopáticas, principalmente en el la cepa NY, dicha banda es la única reconocida.

Se obtuvo un grupo cercano a los 125 KDa, peso aproximado de la proteína NS2/3; el peso molecular de este grupo de bandas varía dentro del intervalo de 128-150 KDa según el cálculo de su migración relativa, estas se presentaron en aproximadamente 35% de los WB. Se considera a la proteína NS2/3 como específica de los biotipos no citopáticos (Lackner *et al.*, 2004; Ridpath, 2005, 2010; Kameyama *et al.*, 2008; Gamlen *et al.*, 2010; Tautz, Tews and Meyers, 2015) pero también se sabe que se puede encontrar presencia de NS2/3 en cepas citopáticas, aunque en concentraciones bajas (Gamlen *et al.*, 2010). Este podría ser el caso de algunos de los resultados, dado que se observa la presencia de bandas cercanas a los 125 KDa en todos los WB de la cepa NADL que tuvieron reacción con los sueros, además se observan el mismo tipo de bandas en aproximadamente 43% de los WB pertenecientes a la cepa DVB2. Se debe destacar que no se observó la presencia de bandas sugerentes a NS2/3 en los WB pertenecientes a la cepa NY, la cual se considera del biotipo no citopático; debido a lo anterior, es necesario realizar estudios más profundos para la tipificación de las bandas obtenidas dentro de este intervalo, ya que de ser NS2/3, la teoría nos dicta que dicha banda debería aparecer en los WB de la cepa NY.

En el caso de bandas cerca de los 53 KDa, peso aproximado de la glicoproteína E2, se evidenció un grupo con un intervalo de peso entre 50 a 59 KDa. Una banda dentro de este rango de peso fue reconocida al menos una vez por cada una de los cepas de VDVB bajo estudio, sin embargo, solo aproximadamente el 25% de los WB reconoció una banda sugerente a la glicoproteína E2.

La región codificante de E2 es considerada de las menos conservadas del genoma de VDVB, aun así, esta glicoproteína ha sido utilizada como candidato para el diseño de vacunas debido a su alta antigenicidad y ser un sitio blanco de anticuerpos neutralizantes (Zemke, 2010; Ridpath 2013). Estudios han demostrado que la glicoproteína E2 contiene determinantes antigénicos que conducen a una respuesta principalmente humoral en el hospedero, la cual posee

epítomos específicos para células B en su extremo N-terminal, además de epítomos específicos para células T (Lang *et al.*, 2014).

La diversidad antigénica mostrada en los WB, aunado al hecho de carecer de la secuencia genómica de la cepa de campo utilizada en el trabajo, evitó que se pudiera reportar a una proteína inmunodominante ideal que sirva para el diagnóstico, en los sueros de campo empleados en este estudio, de las cepas de VDVB tratadas en el mismo. En la Figura 13 también se observa que entre las cepas NY y DVB2, las cuales fueron reconocidas por todos los sueros de campo del estudio, en promedio, se observan más bandas en la cepa DVB2, sugiriendo que los sueros reconocen antigénicamente más proteínas de dicha cepa. DVB2 pertenece al genotipo 2 y al ser mejor reconocida por los sueros de campo, sus proteínas inmunodominantes serían candidatas a antígenos con las cuales diseñar una prueba serológica diagnóstica, por lo que se decidió obtener la secuencia de alguna de ellas.

Estudios e investigaciones en las que se realizan proteínas recombinantes del VDVB ya han sido publicadas; el diseño de plásmidos con inserciones del código de cepas de VDVB se han realizado tanto para genotipo 1 como para genotipo 2, aunque los estudios se enfocan más al genotipo 1 (Arenhart *et al.*, 2016; Oguzoglu *et al.*, 2017). Las publicaciones dirigidas al genotipo 2 generalmente se concentran en la recombinación de la glicoproteína E2 debido a la alta inmunogenicidad que esta posee, así como al carácter neutralizante de los anticuerpos contra esta proteína (Zemke, 2010). Couvreur *et al.* (2007) publicaron el exitoso aislamiento así como la amplificación del código para la glicoproteína E2 perteneciente a la cepa WVD829, considerada no citopática y del genotipo 2; con el fin de probar si los iniciadores citados en dicha publicación podrían amplificar el código de E2 en alguna de las cepas utilizadas en este trabajo, la técnica de RT-PCR descrita en el artículo fue aplicada y exitosamente reproducida para la cepa NY, obteniendo así la secuencia de dicha proteína.

La secuenciación y posterior análisis de la secuencia del producto de RT-PCR, demostró que este pertenece a la glicoproteína E2, al mostrar alto porcentaje de

identidad (92%) con la secuencia de la misma proteína en distintos aislados del VDVB genotipo 2 aunque la cepa NY-1 se reporte como genotipo 1b. Sin embargo, de manera interesante se encontró que dicha secuencia es completamente distinta a la secuencia de la glicoproteína E2 de la cepa de referencia NADL, ya que al compararlas, no se encontró similitud alguna. Lo anterior concuerda con las publicaciones donde se comenta que las diferencias genéticas repercuten a nivel antigénico y que los distintos genotipos, así como subtipos, pueden no reconocerse entre sí (Goyal, 2005; Ridpath, 2005, 2008, 2010; Gómez-Romero *et al.*, 2017). Un estudio en China (Lang *et al.*, 2014), se enfocó en investigar las variaciones genéticas presentes en E2 de distintas cepas aisladas en el país, pertenecientes a ambos genotipos y a 9 subtipos distintos (8 subtipos del genotipo 1 y un subtipo del genotipo 2), al compararlas se demostró un porcentaje de variación en los nucleótidos de aproximadamente 62% y menos del 50% de regiones conservadas, por lo que en el mismo estudio se concluye que las grandes variaciones genéticas se reflejan en diferencias antigénicas, es así que al inmunizar con vacunas comerciales, estas fallan al momento de proteger a los animales ante una infección de distintas cepas de DVB. Es así que podemos suponer que se necesita más de una proteína inmunodominante para diagnosticar DVB en México, por lo cual el aislamiento de proteínas candidatas, por ejemplo E2, de distintas cepas en circulación nacional sería necesario.

Una banda cercana a los 53 KDa en los WB de la cepa NY fue reconocida por el grupo de sueros de animales procedentes del estado de Tamaulipas, lo cual sugiere que tales animales tienen anticuerpos contra la glicoproteína E2 de la cepa NY, por lo tanto, esta secuencia podría usarse como base si se desea seguir con la producción de una proteína recombinante, también, otra opción es la obtención de la secuencia de E2 de distintas cepas circulantes en México y el diseño de una proteína quimérica que exprese las diferentes regiones inmunodominantes de cada glicoproteína.

La técnica de RT-PCR para la región conservada de la 5' UTR resultó ser reproducible y útil para el diagnóstico del virus, ya que gracias a esta fue posible

confirmar la presencia del agente en las expansiones virales realizadas (Figura 9). Del mismo modo, fungió como una herramienta importante de control de calidad en los lotes celulares así como en suplementos para el cultivo (Figura 7). En diversas ocasiones se han reportado tanto líneas celulares como sueros fetales bovinos contaminados con cepas del VDVB, por ejemplo, en el año 2012 Uryvaev *et al*, reportaron haber encontrado líneas celulares de diversos animales, incluyendo humanas, así como suero fetal bovino contaminados con una cepa no citopática del virus de DVB a través del uso de RT-PCR y amplificando la región conservada de la 5'UTR. La contaminación de los productos para el cultivo celular puede dificultar el diagnóstico, dado que pueden darse falsos positivos al realizar RT-PCR o alterar las respuestas antigénicas ante las cepas virales bajo estudio.

## 9 CONCLUSIÓN

- El suero hiperinmune comercial únicamente reconoce a la cepa NADL de las 3 cepas virales utilizadas en este estudio
- 71% de los sueros de campo estudiados reconoce sólo a las cepas NY y DVB2.
- Una banda sugerente a NS3, ubicada cerca de los 80 kDa fue reconocida en el 70% de los WB, incluso en cepas no citopáticas.
- Una banda sugerente a la E2 de NY fue reconocida por los animales de Tamaulipas.
- Se aisló la secuencia de E2 de la cepa NY utilizando iniciadores previamente publicados para E2 genotipo 2
- La secuencia de E2, cepa NY, tiene 92% de identidad con la E2 de aislados de cepas genotipo 2 reportadas en el NCBI.

Las marcadas diferencias antigénicas que resultaron de este estudio entre las cepas NADL, NY y DVB2 al ser enfrentadas al suero de 84 animales sin vacunar, así como a 1 suero control, plantea el escenario de que en caso de realizar un estudio más representativo de la respuesta de los animales a nivel nacional, la variabilidad en el reconocimiento de DVB podría resultar mucho mayor, por lo que son necesarios estudios más amplios de las cepas existentes en las diferentes regiones de México si se desea diseñar un método diagnóstico que resulte certero para los hatos del país.

## 10 PERSPECTIVAS

Debido a las diferencias genómicas y antigénicas entre las cepas estudiadas, no fue posible encontrar una proteína ideal que pueda servir para el diagnóstico serológico general de bovinos en las regiones elegidas en México, por lo cual, se sugiere proponer diseñar una proteína quimérica con el fin de que esta exprese dominios inmunogénicos de una de las proteínas inmunodominantes de distintas cepas de VDVB que se reconozcan en hatos mexicanos.

También se sugiere otra manera de abordar el problema de un diagnóstico certero de DVB en México, que probablemente sea más sencilla y económica, la cual es el aislamiento viral de las cepas circulantes, su expansión y posterior purificación de proteínas inmunodominantes, las cuales pueden adherirse directamente a las microesferas del multiplex.

## 11 REFERENCIAS

Agapov, E. V., Frolov, I., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., Schlesinger, S., & Rice, C. M. (1998). Noncytopathic sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 12989–12994.

Anderson, S., Wakeley, P., Wibberley, G., Webster, K., & Sawyer, J. (2011). 'Development and evaluation of a Luminex multiplex serology assay to detect antibodies to bovine herpes virus 1, parainfluenza 3 virus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus, with comparison to existing ELISA detection methods', *Journal of Immunological Methods*. Elsevier, 366(1–2), pp. 79–88. doi: 10.1016/J.JIM.2011.01.010.

Arenhart, S., Silva Junior, J. V. J., Flores, E. F., Weiblen, R., & Gil, L. H. V. G. (2016). 'Use of homologous recombination in yeast to create chimeric bovine viral

- diarrhea virus cDNA clones', *Brazilian Journal of Microbiology*. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 47(4), pp. 993–999. doi: 10.1016/j.bjm.2016.07.022.
- Ávila García, J. and Cruz Hernández, G. E. (2007) *Diarrea Viral Bovina*. Available at: [http://www.ammveb.net/clinica/diarrea\\_viral\\_bovina.pdf](http://www.ammveb.net/clinica/diarrea_viral_bovina.pdf) (Accessed: 24 February 2017).
- Bio-Rad (2016) *Multiplex Immunoassays*. Available at: <http://www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/multiplex-immunoassays> (Accessed: 9 May 2017).
- Burke, K. P., & Cox, A. L. (2010). Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. *Immunologic research*, 47(1-3), 216-227.
- Burnham, C. A. D., Doern, C. and Binder, S. R. (2013) *Viral Diseases*. Fourth Edi, *The Immunoassay Handbook*. Fourth Edi. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-08-097037-0.00073-7.
- Couvreur, B., Letellier, C., Olivier, F., Dehan, P., Elouahabi, A., Vandenbranden, M., ... & Kerkhofs, P. (2007). 'Sequence-optimised E2 constructs from BVDV-1b and BVDV-2 for DNA immunisation in cattle', *Veterinary Research*, 38, pp. 819–834. doi: 10.1051/vetres:2007037.
- Domingo, E. J. J. H., & Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Reviews in Microbiology*, 51(1), 151-178.
- El Omari, K., Iourin, O., Harlos, K., Grimes, J. M., & Stuart, D. I. (2013). 'Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell Entry Report Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell Entry', *CellReports*. The Authors, 3(1), pp. 30–35. doi: 10.1016/j.celrep.2012.12.001.
- FMVZ (2017) *Servicios de diagnóstico, departamento de microbiología e inmunología*. Available at: [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/servicios/archivos/Servicios\\_Microbiologia.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/servicios/archivos/Servicios_Microbiologia.pdf) (Accessed: 8 May 2017).
- Fourichon, C., Beaudeau, F., Bareille, N., & Seegers, H. (2005). 'Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea



virus', *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1–2), pp. 177–181. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.08.018.

Fulton, R. W., Ridpath, J. F., Ore, S., Confer, A. W., Saliki, J. T., Burge, L. J., & Payton, M. E. (2005). 'Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes', *Veterinary Microbiology*, 111(1–2), pp. 35–40. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.002.

Gamlen, T., Richards, K. H., Mankouri, J., Hudson, L., McCauley, J., Harris, M., & Macdonald, A. (2010). 'Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter', *Journal of General Virology*, 91(1), pp. 133–144. doi: 10.1099/vir.0.016170-0.

Giavedoni, L. D. (2005) 'Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology', *Journal of Immunological Methods*. Elsevier, 301(1–2), pp. 89–101. doi: 10.1016/J.JIM.2005.03.015.

Gómez-Romero, N., Basurto-Alcántara, F. J., Verdugo-Rodríguez, A., Bauermann, F. V., & Ridpath, J. F. (2017). 'Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus in cattle from Mexico', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(3), pp. 362–365. doi: 10.1177/1040638717690187.

Goyal, S. M. (2005) 'Diagnosis', in Goyal, S. M. and Ridpath, J. F. (eds) *Bovine Viral Diarrhoea Virus Diagnosis, Management, and Control*. Ames: Blackwell Publishing, pp. 197–208.

Hernández-Medrano, J. H. (2015) *Desarrollo de un sistema inmuno-diagnóstico multiplex para enfermedades infecciosas en ganado bovino en regiones tropicales*. Mexico. Available at: [http://congreso.fmvz.unam.mx/pdf/memorias/Bovinos/JUAN\\_HERNANDEZ.pdf](http://congreso.fmvz.unam.mx/pdf/memorias/Bovinos/JUAN_HERNANDEZ.pdf) (Accessed: 15 January 2018).

Inifap (2015) *Lista Oficial De Precios Y Tarifas*. Available at:

[http://www.inifap.gob.mx/Documents/transparencia/trans\\_foca/2016/Transparencia\\_Focalizada/Productos\\_Servicios/Lista\\_PS/Lista de precios Julio 2015.pdf](http://www.inifap.gob.mx/Documents/transparencia/trans_foca/2016/Transparencia_Focalizada/Productos_Servicios/Lista_PS/Lista de precios Julio 2015.pdf)  
(Accessed: 15 March 2017).

Jordan, R., Wang, L., Graczyk, T. M., Block, T. M., & Romano, P. R. (2002) 'Replication of a Cytopathic Strain of Bovine Viral Diarrhea Virus Activates PERK and Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis of MDBK Cells', *Journal of Virology*, 76(19), pp. 9588–9599. doi: 10.1128/JVI.76.19.9588.

Kameyama, K. I., Sakoda, Y., Matsuno, K., Ito, A., Tajima, M., Nakamura, S., & Kida, H. (2008) 'Cleavage of the NS2-3 protein in the cells of cattle persistently infected with non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus', *Microbiology and Immunology*, 52(5), pp. 277–282. doi: 10.1111/j.1348-0421.2008.00013.x.

Karp, G. (2013) *Biología Celular y Molecular*. 7th edn. Edited by J. De León Fraga. Mexico: Mc Graw Hill.

Kelling, C. L. and Topliff, C. L. (2013) 'Bovine maternal , fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhea virus infections', *Biologicals*. Elsevier Ltd, 41(1), pp. 20–25. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.09.006.

Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H. J., Gorbalenya, A. E., & Tautz, N. (2004). 'Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus', *Journal of Virology*, 78(19), p. 10765. doi: 10.1128/JVI.78.19.10765.

Lang, Y., Gao, S., Du, J., Shao, J., Cong, G., Lin, T., ... & Chang, H. (2014). Polymorphic genetic characterization of E2 gene of bovine viral diarrhea virus in China. *Veterinary microbiology*, 174(3-4), 554-559.

López Pérez, T. de J. (2014) *Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Nzou, S. M., Fujii, Y., Miura, M., Mwau, M., Mwangi, A. W., Itoh, M., ... & Kaneko, S. (2016) 'Development of multiplex serological assay for the detection of human

African trypanosomiasis', *Parasitology International*. The Authors, 65(2), pp. 121–127. doi: 10.1016/j.parint.2015.10.008.

OĞUZOĞLU, T., D MUZ, M. T., KOÇ, B., ÖZŞAHİN, E., BURGU, İ., AKÇA, Y., & DEMİRBAĞ, Z. (2017) 'Expression and production of recombinant proteins from immunodominant E gene regions of bovine viral diarrhoea virus 1 (BVDV-1) Turkish field strains for prophylactic purpose', *Revue De Medecine Veterinaire*, 168(7–9), pp. 183–191.

OIE. (2013) 'Diarrea viral bovina', *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*, 14(1), pp. 42–53.

Peterhans, E., Bachofen, C., Stalder, H., & Schweizer, M. (2010). 'Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): Emerging pestiviruses doomed to extinction', *Veterinary Research*, 41(6). doi: 10.1051/vetres/2010016.

Ridpath, J. F. (2005) 'Classification and Molecular Biology', in Goyal, S. M. and Ridpath, J. F. (eds) *Bovine Viral Diarrhoea Virus Diagnosis, Management, and Control*. 1st editio. Blackwell Publishing, pp. 65–80. doi: 10.1128/JVI.02626-10.

Ridpath, J. F. (2008) 'Bovine Viral Diarrhoea Virus', in BWJ, M. and MHV Van Regenmortel (eds) *Encyclopedia of Virology*. 3rd editio. Elsevier, pp. 374–380. doi: 10.1128/JVI.02626-10.

Ridpath, J. F. (2010) 'Bovine Viral Diarrhoea Virus: Global Status', *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. Elsevier Ltd, 26(1), pp. 105–121. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.007.

Ridpath, J.F., 2013. Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals* 41, 14–19.

Rosete, F. J. V., Zarate Martínez, J. P., Granados Zurita, L., & Barradas Piña, F. T. (2014) *Control zosanitario de la diarrea viral bovina , rinotraqueitis infecciosa bovina , neosporosis y leptospirosis en bovinos en pastoreo en el trópico húmedo de Tabasco.*, inifap. HUimanguillo: INIFAP.

Safarpour Dehkordi, F. (2011) 'Prevalence study of Bovine viral diarrhoea virus by evaluation of antigen capture ELISA and RT-PCR assay in Bovine, Ovine, Caprine,

Buffalo and Camel aborted fetuses in Iran', *AMB Express*, 1(1), p. 32. doi: 10.1186/2191-0855-1-32; 10.1186/2191-0855-1-32.

Solis-Calderon, J. J., Segura-Correa, V. M. and Segura-Correa, J. C. (2005) 'Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors', *Preventive Veterinary Medicine*, 72(3–4), pp. 253–262. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.06.004.

Tautz, N., Tews, B. A. and Meyers, G. (2015) *The Molecular Biology of Pestiviruses*. 1st edn, *Advances in Virus Research*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.aivir.2015.03.002.

Uryvaev, L. V., Dedova, A. V., Dedova, L. V., Ionova, K. S., Parasjuk, N. A., Selivanova, T. K., ... & Podchernjaeva, R. J. (2012). 'Contamination of cell cultures with bovine viral diarrhea virus (BVDV)', *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 153(1), pp. 77–81. doi: 10.1007/s10517-012-1648-1.

Wessels, E., Rusman, L. G., Van Bussel, M. J. A. W. M., & Claas, E. C. J. (2014) 'Added value of multiplex Luminex Gastrointestinal Pathogen Panel ( xTAG ® GPP ) testing in the diagnosis of infectious gastroenteritis .', *European Society of Clinical Infectious Diseases*. European Society of Clinical Infectious Diseases, 20(3), pp. O182–O187. doi: 10.1111/1469-0691.12364.

Workman, A. M., Heaton, M. P., Harhay, G. P., Smith, T. P., Grotelueschen, D. M., Sjeklocha, D., ... & Chitko-McKown, C. G. (2016) 'Resolving *Bovine viral diarrhea virus* subtypes from persistently infected U.S. beef calves with complete genome sequence', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(5), pp. 519–528. doi: 10.1177/1040638716654943.

Yarnall, M. J. and Thrusfield, M. V (2015) 'Paper Engaging veterinarians and farmers in eradicating bovine viral diarrhoea : a systematic review of economic impact', *veterinary reord*, 181(13), pp. 1–8. doi: 10.1136/vr.104370.

Zarate Martínez, J., Rosete Fernández, J., Rios Utrera, Á., & Barradas Piña, F. (2013). Situación de la diarrea viral bovina (BVD) en ranchos del área de influencia

del Campo Experimental La Posta del INIFAP, en el centro de Veracruz.

Zemke, von J. M. L. (2010) *Characterization of recombinant BVDV-2 vaccine prototypes based on packaged replicons and replication competent deletion mutants*. Facultad de Medicina Veterinaria Ludwig-Maximilians-University Munich.

# ANEXOS

## ANEXO 1

Reactivos

Buffer de Corrida:

Glicina ---> (0.192 M)	14.4 g
Tris-Base -> (0.025 M)	3 g
SDS	1 g o 10 mL al 10%

En 300 mL se disuelve primero la glicina, después se agrega el Tris-base y al finalizar se agregan 10 mL de SDS al 10% o 1 g de SDS. Se afora a 1 L (no ajustar pH)

Buffer de Carga:

Preparación a 2X

dH <sub>2</sub> O	4 mL
Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M)	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10%	1.6 mL
β-Mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de Bromofenol (0.1%)	0.2 mL

PBS 10x

Para 500 mL se necesitan:

Cloruro de Sodio (NaCl)	43.85 g
Fosfato de Sodio Monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.75 g
Fosfato de Sodio Dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	6.5 g

Se disuelven los compuestos en un volumen de agua destilada (aproximadamente 300 mL) y una vez disueltos, se ajusta el pH a 7.4. Ajustado el pH se afora a 500 mL.

#### Buffer de Transferencia

Tris-Base	4.8 g
Glicina	23 g
Metanol	320 mL
dH <sub>2</sub> O	1.6 L
SDS 10%	100 µL

Una vez preparado aproximadamente sirve para 5 transferencias