



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE PESTIVIRUS EN UNGULADOS DE
FUANA SILVESTRES EN CAUTIVERIO EN MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA:

MVZ. JOCELYN MEDINA GUDIÑO

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

M. en C. JOSÉ RAMIREZ LEZAMA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

Dr. LUIS PADILLA NORIEGA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

Febrero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

Tema	Página
Resumen	VIII
Abstract	IX
1. Introducción	1
1.1 Características del género <i>Pestivirus</i>	1
1.1.1 Clasificación taxonómica	1
1.1.2 Morfología	1
1.1.3 Genoma	2
1.1.4 Proteínas virales	3
1.1.4.1 Proteínas no estructurales	3
1.1.4.2 Proteínas estructurales	6
1.1.5 Replicación del género <i>Pestivirus</i>	8
1.1.6 Biotipos	10
1.2 Patogenia del género <i>Pestivirus</i>	10
1.2.1 Hospedador	10
1.2.2 Transmisión	12
1.2.2.1 Infección posnatal en ganado no gestante	13
1.2.2.2 Infección en ganado gestante	14
1.2.2.3 Persistentemente infectados y la enfermedad de las mucosas	15
1.2.2.4 Infecciones mezcladas	15
1.3 Inmunidad	16
1.4 Diagnóstico	17
1.4.1 Aislamiento viral	18
1.4.2 Detección del ARN viral	18
1.4.3 Inmuno ensayo enzimático (ELISA)	18
1.4.4 Inmunohistoquímica	19
1.5 Vacunas	19

1.6 Pestivirus clásicos y emergentes	20
1.6.1 Diarrea viral bovina y Enfermedad de las Mucosas	20
1.6.2 Enfermedad de las fronteras	21
1.6.3 Fiebre porcina clásica	21
1.6.4 Virus mucosal de las jirafas	21
1.6.5 Virus Pronghorn	22
1.6.6 Pestivirus de Túnez en ovejas	22
1.6.7 Pestivirus tipo HoBi	22
1.6.8 Virus Bungowannah	23
2. Justificación	27
3. Hipótesis	28
4. Objetivo	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos específicos	30
5. Material y Métodos	31
5.1 Cepa de referencia	31
5.1.1 Titulación de la cepa de referencia	31
5.2 Muestras de trabajo (suero)	32
5.3 Muestras de trabajo (plasma)	32
5.3.1 Obtención de muestras sanguíneas	33
5.3.2 Extracción de ARN total	34
5.3.3 Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	34
5.4 Secuenciación	36
5.5 Construcción y análisis filogenético	37
5.6 Aislamiento viral	37
5.6.1 Titulación del aislamiento	38
6. Resultados	38
6.1 Título de la cepa viral	38

6.2 Amplificación del fragmento de la región 5'UTR en muestras de suero	39
6.3 Análisis filogenético de muestras de suero	39
6.4 Aislamiento viral	41
6.4.1 Título de las muestras positivas	41
7. Discusión	41
8. Conclusiones	46
9. Prospectiva	47
10. Anexos	48
Anexo I. Identificación de muestras	48
Anexo II. Relación de muestras positivas y negativas	62
Anexo III. Secuencias detectadas de Pestivirus	76
Referencias	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Morfología del género <i>Pestivirus</i>	1
2. Diagrama del Genoma de los pestivirus	8
3. Replicación del género <i>Pestivirus</i>	9
4. Árbol de cercanía basado en secuencias del genoma completo de pestivirus representativos	24
5 A. Diagrama del genoma del <i>Pestivirus</i>	25
A.	
5 B. Secuencias de las regiones del genoma del Pestivirus A amplificadas mediante RT-PCR	26

6. Análisis filogenético de pestivirus basados en la región 5'UTR	40
7. Posibles sitios de inserción de la secuencia de ubiquitina en el genoma del Virus de la diarrea viral bovina	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de pestivirus, distribución y principal hospedero	11
2. Especies y genotipos de pestivirus aislados a partir de animales silvestres	12
3. Resumen de muestras de suero	32
4. Resumen de muestras tomadas de plasma	32
5. Título obtenido de la cepa de referencia	38
6. Resumen del número de muestras positivas a pestivirus por RT-PCR a partir de muestras de suero	39
7. Título obtenido de la muestra de suero de un venado gamo 7916	41

Abreviaturas Utilizadas

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico

ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
cm²	Centímetros cuadrados
CP	Citopático
DEPC	Dietilpirocarbonato
DICC	Dosis infectante en cultivo celular
DVB	Diarrea viral bovina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
G	Gramos
H	Hora
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Virus</i>
IFN	Interferón
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LDLr	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>
MDBK	<i>Madin-Derby Bovine Kidney</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MI	Mililitros
Min	Minutos
NADL	<i>National Animal Disease Laboratory</i>
NCP	No citopático
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i>
ORF	<i>Open Reading frame</i> ; marco de lectura
PABP	<i>Poly (A)- binding protein</i>
Pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI	Persistentemente Infectado
Rpm	Revoluciones por minuto

RT-PCR	<i>Reverse transcription- Polymerasa Chain Reaction</i>
RdRP	Polimerasa de ARN dependiente de ARN
SFB	Suero Fetal Bovino
SLI	<i>Stem loop I</i>
SLII	<i>Stem loop II</i>
SLIII	<i>Stem loop III</i>
U	Unidades
UTR	<i>Untranslated region</i> ; región no traducida
vDVB	Virus de la diarrea viral bovina
vDVB-1	Virus de la diarrea viral bovina tipo 1
vDVB-2	Virus de la diarrea viral bovina tipo 2
vEF	Virus de la enfermedad de las fronteras
vFPC	Virus de la fiebre porcina clásica
TCID	<i>Tissue culture infective doses</i>
%	Porcentaje

RESUMEN

Los miembros del género *Pestivirus* (familia *Flaviviridae*), son virus envueltos, con genoma ARN de cadena simple con polaridad positiva que afectan de manera global tanto a rumiantes como a suinos. El género *Pestivirus* contiene cuatro especies de virus típicos: virus de diarrea viral bovina tipo 1 (VDVB-1) y tipo 2 (VDVB-2), virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) y virus de la enfermedad de las fronteras (VEF). Además de cinco especies de virus emergentes: el pestivirus de Tunisió de pequeños rumiantes, pestivirus de Bungowannah en cerdos, pestivirus de las jirafas, virus de Pronghorn en ciervos y el virus tipo HoBi de bovinos.

Los virus emergentes tienen como reservorios, en la mayoría de los casos, a animales de fauna silvestre, en los cuales producen signología respiratoria, digestiva, desórdenes hemorrágicos, inmunosupresión y problemas reproductivos como abortos, fetos nacidos muertos o momificados y enfermedades congénitas. Lo anterior ha generado pérdidas económicas estimadas en hasta 64 millones de dólares por año en Estados Unidos.

Diversos factores como los movimientos migratorios, así como el uso de praderas comunes, promueven la diseminación de pestivirus entre animales domésticos y silvestres. En países como Italia, España y Suecia se han reportado brotes de pestivirus emergentes en ungulados silvestres. Sin embargo, la prevalencia de pestivirus típicos y emergentes en animales silvestres de México se desconoce actualmente. En México, la información disponible sobre la presencia de pestivirus es escasa y se encuentra limitada a poblaciones de bovinos domésticos. Entre los pestivirus detectados hasta el momento se encuentran el virus de la enfermedad de las fronteras (Veracruz) y el virus de diarrea viral bovina (Yucatán y Norte del país).

Al considerar que estos virus pueden transmitirse entre ungulados domésticos y silvestres, se propone realizar la detección y genotipificación de pestivirus para conocer su distribución en algunas poblaciones de animales silvestres de México. Se realizó la técnica de Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para detectar un fragmento de la región 5'UTR a partir de muestras de suero de diferentes ungulados de fauna silvestre en cautiverio procedentes de diferentes zonas de México: posteriormente las muestras positivas se secuenciaron para determinar sus relaciones filogenéticas con otros pestivirus. Los resultados demostraron la presencia del virus de la Diarrea Viral Bovina genotipo 1b en cerca del 1% de 365 muestras.

Adicionalmente se realizó el aislamiento viral obteniendo un aislamiento citopático con el efecto de vacuolización.

ABSTRACT

Members of the *Pestivirus* genus, within the family *Flaviviridae*, are enveloped viruses with single-stranded positive-sense RNA genomes which globally affect ruminants and swines. The genus *Pestivirus* contains four typical virus species: bovine viral diarrhea virus type 1 (VDVB-1) and type 2 (VDVB-2), classical swine fever virus (VFPC) and borderline disease virus (VEF). This genus also includes five emerging virus species: Tunisian pestivirus which infects small ruminants, Bungowannah pestivirus which infects pigs, giraffe pestivirus, Pronghorn virus which infects deer and HoBi-like virus, an atypical bovine pestivirus.

In most cases, emerging pestiviruses have wild animal reservoirs, in which they produce respiratory and digestive signs, bleeding disorders, immunosuppression and reproductive problems such as abortions, dead or mummified fetuses, and congenital diseases. Losses due to pestivirus infections may rise up to 64 million dollars per year just in the United States.

Several factors, such as common grassland usage and animal migration, promote the spread of pestiviruses between domestic and wild animals. Outbreaks of emerging pestiviruses in wild ungulates have been reported in countries such as Italy, Spain and Sweden. However, the prevalence of typical and emerging pestiviruses in wild animals from Mexico is currently unknown. The information available on the presence of pestiviruses in Mexico is scarce and limited to populations of domestic cattle. Currently, border disease virus (Veracruz) and bovine viral diarrhea virus (Yucatan and northern states of Mexico) are among the pestiviruses so far detected in this country.

Considering that pestiviruses can be transmitted between domestic and wild ungulates, the aim of this study was to detect and identify the currently circulating genotypes of pestiviruses among some populations of wild animals from Mexico, in order to recognize their distribution in this territory. Serum samples from captive wildlife ungulates of different areas from Mexico were analyzed by Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction in order to detect a fragment of the viral 5' UTR. Positive samples were sequenced to determine their phylogenetic relationship with other pestiviruses. Results from this study demonstrated the presence of Bovine Viral Diarrhea virus genotype 1b in about 1% of the samples (n = 365).

Additionally, a cytopathic virus from a positive sample was isolated on MDBK cells.

DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE PESTIVIRUS EN UNGULADOS DE FAUNA SILVESTRES EN CAUTIVERIO EN MÉXICO

1. Introducción

1.1 Características del género *Pestivirus*

1.1.1 Clasificación taxonómica

El género *Pestivirus* incluido dentro de la familia *Flaviviridae*, afecta de manera global tanto a rumiantes como a suinos. Este género contiene cuatro especies reconocidas: virus de Diarrea Viral Bovina 1 (vDVB-1), virus de Diarrea Viral Bovina 2 (vDVB-2), virus de Fiebre porcina clásica (vFPC) y virus de Enfermedad de las fronteras (vEF).¹ Además, incluye a los virus emergentes: pestivirus del antílope pronghorn, pestivirus porcino, pestivirus de la jirafa, pestivirus tipo Ho-Bi, pestivirus tipo Aydin, pestivirus de la rata y pestivirus atípico porcino.²

1.1.2 Morfología

Los pestivirus son pleomórficos, con un diámetro de 40-60 nanómetros, envueltos por una capa lipídica con tres glicoproteínas que recubren la cápside viral.³ La cápside tiene una simetría icosaédrica con un diámetro de 25-37 nanómetros, de naturaleza proteica constituida por la proteína C, como se observa en la figura 1.

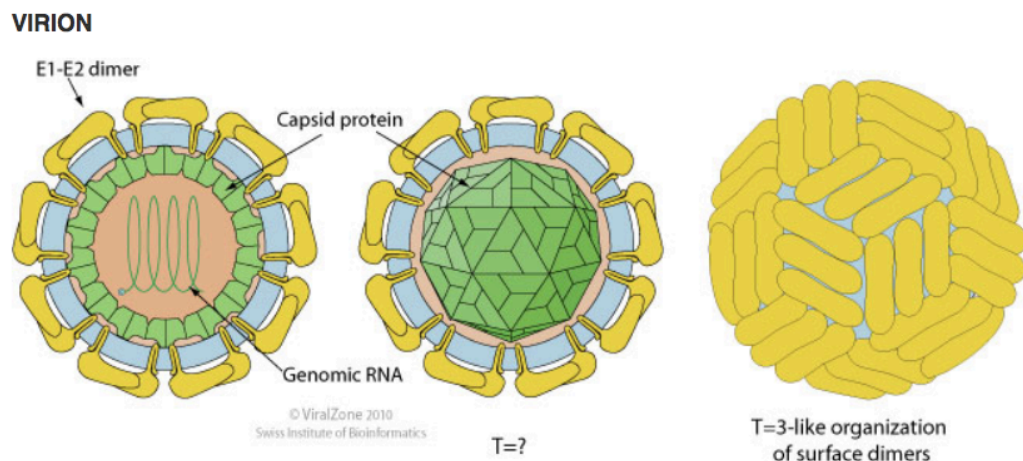


Figura 1. Morfología del género *Pestivirus*. <https://viralzone.expasy.org/>

1.1.3 Genoma

Los pestivirus son ARN de cadena sencilla positiva, no segmentado y una longitud aproximadamente de 12.3 kb. Contienen un marco de lectura de 4000 codones que es flanqueado por regiones no traducidas 5' (5'UTR) y 3' (3'UTR) que codifican para una poliproteína. La poliproteína traducida es procesada posteriormente por proteasas que dan lugar a proteínas estructurales como la proteína C (cápside) y proteínas de envoltura E^{rns}. E1 y E2, las proteínas no estructurales como N^{pro} NS2, NS3, NS3-3, NS4B, NS5A y NS5B. La N^{pro} y la E^{rns} son únicas para los pestivirus y se pueden encontrar en todos los miembros del género, pero no en otros miembros de la familia *Flaviviridae*. N^{pro} se encuentra en el extremo amino terminal de la poliproteína viral y es una proteasa con actividad autocatalítica.⁴⁻⁶ E^{rns} es una glicoproteína de envoltura con actividad de ARNasa.^{7,8} Ambas proteínas se encuentran involucradas en la supresión de la respuesta inmune mediada por INF de tipo 1.⁹⁻¹⁶

Las proteínas estructurales como la E^{RNS}, la E1 y la E2 están asociadas con la envoltura del virión, estas tres proteínas están altamente glicosiladas y poseen los determinantes antigénicos del virus. La E^{RNS} y la E1 poseen epítomos neutralizantes que son importantes en el control de la enfermedad.

Región 5'UTR

En los pestivirus la región 5'UTR inicia con una secuencia capaz de formar una horquilla estable. Esta horquilla consiste en una región de tallos conservada y una región de asa variable. La formación del tallo es importante en la traducción mientras que en la transcripción es dependiente de secuencias ubicadas en el asa de la horquilla. Solamente los primeros cuatro residuos de la región conservada 5'-terminal son esenciales para la replicación del virus de la diarrea viral bovina.

Para inducir una eficiente traducción la región 5'UTR del ARN de los pestivirus contiene un sitio interno de entrada ribosomal (IRES, por sus siglas en inglés) que esta disponible para reclutar directamente la subunidad pequeña y posicionarla en el sitio de inicio de la traducción. Esto explica por que la traducción inicia exactamente en este AUG a pesar de la

presencia de múltiples codones de inicio. Los IRES en los pestivirus son capaces de promover la traducción en el sitio definido incluso cuando este codón se encuentre mutado.¹⁷

Región 3'UTR

La región 3'UTR representa el primer elemento de ARN que tiene contacto con la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRP). La proteína RdRP es la última proteína codificada por el ORF de los pestivirus lo que representa el término de la traducción. La región 3'UTR es capaz de doblarse para formar tres horquillas llamadas SLI, SLII y SLIII. SLI esta localizada cerca del final de 3', SLII se encuentra en el medio y SLIII en la región donde se encuentra el codón de paro.¹⁸

La región terminal del 3'UTR del ARN de los pestivirus muestra importantes diferencias con los ARNm eucariontes, ya que no contiene una cola de Poli (A) que en los ARNm estándar provee estabilidad. Una función más importante de la cola de Poli (A) es darle soporte al inicio de la traducción mediante la vía de la pseudocircularización del ARN mediante la proteína de unión PAPB, que interactúa con el sitio 3' y el 5'-cap. En los pestivirus esta función queda a cargo de la proteína NAFR.¹⁹

1.1.4 Proteínas virales

1.1.4.1 Proteínas no estructurales

N^{pro}

N^{pro} o P20 es la primera proteína codificada por el genoma de los pestivirus. Tiene una longitud de 168 aminoácidos y un peso de 20 kDa. La porción amino terminal de la proteína codifica una serina proteasa, responsable del corte entre su carboxilo terminal y la siguiente proteína, la proteína C. Su actividad autoproteolítica la adquirió de la cepa del virus de la diarrea viral bovina NADL. La región proteolítica se le atribuye a la escisión de 23 kDa del amino terminal por el cual fue nombrada N proteasa terminal. Debido a sus secuencias y al arreglo de residuos catalíticos se ha clasificado en una nueva familia de proteasas llamado

C53.²⁰N^{pro} provoca la degradación del factor regulador del interferón 3 mediante la ruta del proteosoma.¹³ Es única del género *Pestivirus*.

p7

P7, es una proteína de 7 kDa codificada por una secuencia del genoma ubicada entre las secuencias de E2 y NS2-3. La escisión entre E2 y p7 se da por una peptidasa señal de la célula hospedadora, en ocasiones esta escisión se produce de manera incompleta resultando en la proteína E2-p7. Se sabe que la proteína p7 se requiere para la producción de virus infecciosos²¹, también la porción carboxilo terminal funciona como una secuencia señal para la translocación de la proteína NS2 a la membrana.²² Estudios sobre la proteína p7 del virus de la hepatitis C, un virus del género *Hepacivirus* que al igual que los *Pestivirus* pertenece a la familia *Flaviviridae*, sugieren que puede tener una función en el ensamblaje y entrada del virus al formar un canal iónico en la membrana.²³ Aún no es claro si la proteína p7 es estructural o no estructural.²⁴

NS2-3

NS2-3 o p125, es una proteína multifuncional constituida por 1300 aminoácidos. En los pestivirus es la proteína más conservada.²⁵ Está formada por la unión de las proteínas NS2 y NS3, y su escisión determina el biotipo del vDVB (su actividad en un cultivo celular). La región N-terminal es hidrofóbica lo que sugiere un papel en el anclaje de la membrana, el dominio colindante tiene un “dedo” de zinc rico en cisteína; los 146 aminoácidos en la región C-terminal del dedo de zinc forman un dominio con actividad de serina proteasa responsable de la escisión del resto de la poliproteína en proteínas no estructurales. El siguiente par de dominios tienen actividad de ATPasa y helicasa necesarios para la replicación del ARN.³ Adicionalmente, la proteína NS2-3 participa en el ensamblaje de partículas virales y es requerida para la producción de partículas virales infecciosas.²² Es una proteína muy estudiada debido a que se han encontrado alteraciones genéticas que resultan en la separación de la proteína en NS2 y NS3 o la duplicación de NS3. De los *Pestivirus*, el vDVB es el único en donde la presencia de NS3 es sugerente de una cepa citopática, no así para el vFPC y el vEF en donde la presencia de la proteína NS3 no corresponde necesariamente a la presencia

de efecto citopático. Los animales infectados o vacunados con virus modificados desarrollan una respuesta humoral contra ésta proteína, la cual es considerada responsable de las reacciones cruzadas con los vEF y vFPC.²⁶

NS2

NS2 o p54, es una proteína hidrofóbica con función de cisteína proteasa, con un peso de 54kDa.^{27,28}

NS3

NS3 o p80, es una proteína con un peso de 80 kDa que se expresa en todas las cepas citopáticas, surge a partir de la escisión de la proteína NS2-3. La tercera parte de la porción carboxilo terminal codifica una serina proteasa que funciona con la proteína NS4A para mediar el procesamiento de todos los sitios de escisión. Es responsable de los cortes que se hacen en la poliproteína, es decir, escinde su propio extremo carboxilo terminal, entre NS3 y NS4A, NS4A y NS4B, NS4B y NS5A, y NS5A y NS5B, pero no es responsable del corte en NS2-3²⁹; son las proteasas celulares las que realizan las demás digestiones proteicas.³⁰ Forma parte del complejo de replicación; su dominio carboxilo terminal codifica una ARN helicasa y una nucleótido trifosfatasa, que son esenciales para la replicación del ARN.³¹ Es considerada una proteína marcadora para el vDVB citopático.³²

NS4A

NS4A o p10, es una proteína con una secuencia de 64 aminoácidos de 7kDa. Funciona como un cofactor de la proteasa de NS3.³³

NS4B

NS4B o p38, proteína de 33kDa que participa en la citopatogenicidad viral, es decir, que interviene en el cambio de un virus citopático a uno no citopático en los cultivos celulares, además forma parte del complejo de replicación .³⁴

NS5A

NS5A o p58, es una fosfoproteína de 55kDa asociada a cinasas celulares y forma parte del complejo de replicación.³⁵

NS5B

NS5B o p75, proteína de 75-81 kDa la cual es necesaria para el ensamblaje y la liberación de las partículas virales de la célula hospedadora.³⁶ Se requiere para la replicación viral³⁷ ya que posee actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp)³ debido a que contiene la secuencia GDD (Gly-Asp-Asp) común en todas las polimerasas.²⁹

1.1.4.2 Proteínas estructurales

Proteína C

Es la primera proteína estructural en la poliproteína de los pestivirus,³⁸ tiene un peso de 14 kDa y una longitud de 120 aminoácidos. Su porción N- terminal es generada por la escisión autocatalítica de la N^{pro}. Su secuencia puede ser modificada en varias regiones, un tramo de aminoácidos básicos puede ser eliminado completamente. Tiene un papel importante en el empaquetamiento del ARN y la morfogénesis del virión.³⁹

E^{rns}

Es la siguiente proteína después de la proteína C en la poliproteína en el género de los Pestivirus y es la primer de las glicoproteínas de la envoltura, entre sus funciones se encuentra el anclaje de membrana y su actividad RNasa. E^{rns} es única en los pestivirus⁴⁰ Sirve como

blanco para anticuerpos neutralizantes. Tiene un peso molecular de 42-48 kDa, esta altamente glicosilada. Tiene una longitud de 227 aminoácidos y contiene de 8-9 cisteínas conservadas que forman puentes disulfuro intra e intermoleculares.

E1

Es una proteína estructural que pesa de 25-33 kDa, posee un dominio transmembranal. La región amino terminal es generada mediante el procesamiento de esta con la E^{ms} por la SPasa. Contiene de 2 a 3 sitios de N-glicosilación y dos regiones hidrofóbicas que sirven como sitio de anclaje a membrana, forma heterodímeros con la proteína E2 unidos por medio de enlaces disulfuro.⁴¹

E2

La proteína E2, también conocida como gp53 es la principal glicoproteína integral de membrana con un peso de 55 kDa y una longitud de 375-400 aminoácidos que contiene de 4 a 6 sitios de N-glicosilación, forma homodímeros y heterodímeros con la proteína E1 unidos por puentes disulfuro. Se ha demostrado que la formación de los heterodímeros E1-E2 es esencial para la entrada del virus a la célula.⁴² El gen que codifica para esta proteína contiene una región variable altamente mutable que genera cambios antigénicos dando lugar a diversas cepas del vDVB.²⁹ E2 posee el principal epítoto neutralizante e inmunodominante, es decir, tiene la mayor capacidad de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes.⁴³ Es esencial para la infectividad del virus, así como para determinar el tropismo del virus en cultivos celulares.⁴⁴

Como se puede observar en la siguiente figura 2 una representación gráfica del genoma de los pestivirus.

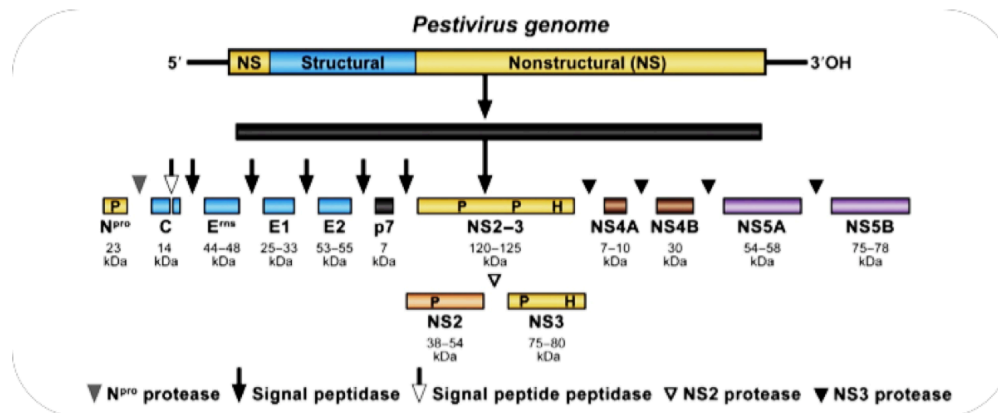


Figura 2. Diagrama del Genoma de los pestivirus. Tautz. N. et al. (2015) “The molecular Biology of Pestivirus”. Advances in Virus Reserch, volume 93.pp 77-160.

1.1.5 Replicación del género *Pestivirus*

La entrada del virus por endocitosis requiere de varias etapas. En la etapa inicial, el virus se une a la superficie de la célula mediante la interacción entre la proteína de envoltura E^{ms} y un receptor de glicosaminoglicano. El siguiente paso, consiste en la fijación entre la proteína de envoltura E2 y el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), seguido de la internación mediante endocitosis.

El mecanismo de liberación del ARN genómico en el citoplasma de la célula es desconocido, pero se cree que probablemente involucra la acidificación de las vesículas endocitadas. El ARN genómico (ssRNA+) se traduce para generar las proteínas virales necesarias para la replicación. Después de la traducción para producir proteínas virales el ARN comienza con la síntesis de cadenas complementarias negativas. Se ha propuesto que esta estructura secundaria ocasiona que la región 5'UTR habilite el cambio del ARN viral como un templado para la traducción a un molde para la replicación. Utilizando estas cadenas negativas de ARN como un molde se sintetizan cadenas positivas. Ya que las proteínas virales no son detectadas en la superficie de células infectadas, se cree que los viriones maduros en las vesículas intracelulares son liberados por exocitosis.

Como resultado de la traducción del mensajero se genera una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos que es procesada para dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus. Este proceso es resultado de la actividad de

proteasas tanto celulares como virales. Las proteínas procesadas, tanto estructurales como no estructurales, contribuyen al proceso de replicación del ARN.⁴⁵

La replicación y síntesis del ARN viral ocurre en una extendida red de membranas modificadas. Al menos tres estructuras membranosas han sido identificadas en células infectadas con flavivirus: sacos membranosos o paquetes de vesículas (Vp), vesículas de membrana (Ve) y complejo de membranas (CM). Los Vp son pequeños racimos de Ve formados por modificaciones en la membrana del retículo endoplásmico y se usan como sitios de replicación del virus.

El ensamblaje de las partículas virales recién sintetizadas se realiza en el retículo endoplásmico⁴⁶ y adquieren su envoltura a partir de las membranas intracelulares de las vesículas citoplasmáticas; las partículas virales son transportadas a través de la vía secretoria y liberadas por exocitosis⁴⁷, como se observa en la figura 3.

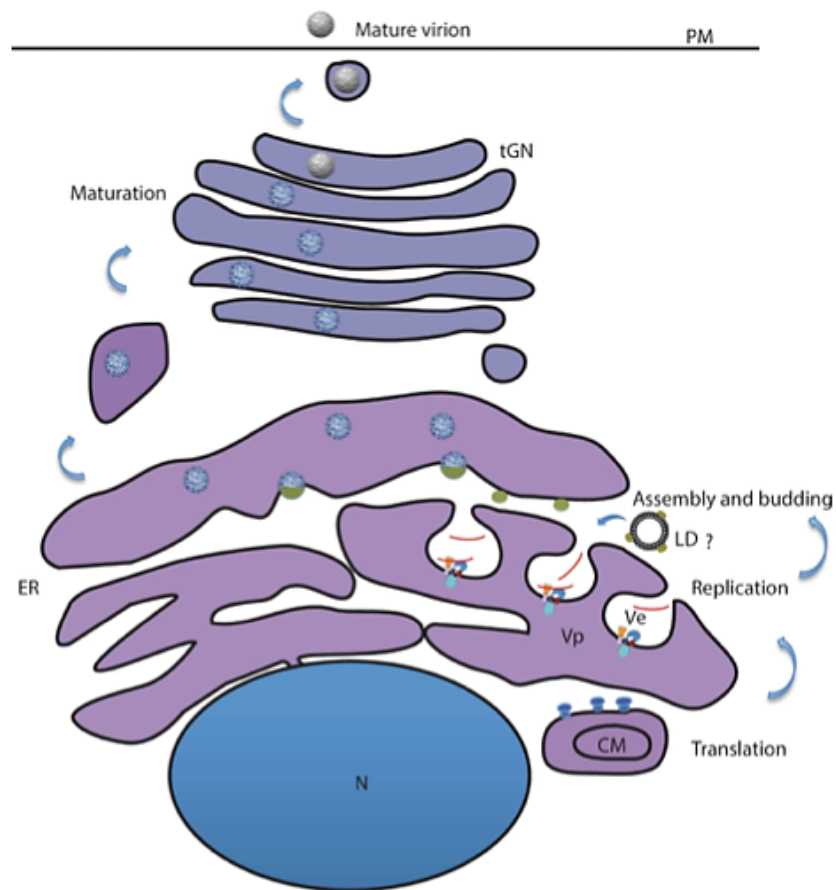


Figura 3. Replicación del género *Pestivirus*. Modificado de Swapna A. et al. *Virology*. 2014; 0:134-142.

1.1.6 Biotipos

De acuerdo con su capacidad para producir efectos citopáticos en cultivos celulares, los pestivirus se clasifican en dos biotipos: citopático y no citopático,^{17,48} sin embargo, la patogenicidad *in vitro* no se correlaciona con la patogenicidad *in vivo*.⁴⁹ La mayoría de los aislamientos en campo son de virus no citopáticos, la literatura menciona que solo los virus no citopáticos generan animales persistentemente infectados.¹⁷

El biotipo citopático (CP) produce vacuolización citoplasmática⁵⁰ y muerte celular en el cultivo celular y el no citopático (NCP) no produce alteración alguna.⁵¹

Ya que el BVDV puede contaminar cultivos celulares y sueros fetales de bovino, los reportes de aislamientos de este virus, en ausencia de pruebas complementarias, deben considerarse con precaución.⁵²

1.2 Patogenia del género *Pestivirus*

1.2.1 Hospedador

Los *Pestivirus* pueden infectar tanto animales domésticos como silvestres.⁵² Se han identificado en diversos animales pertenecientes a las familias *Cervidae* (corzo,⁵³ ciervo rojo,^{54,55} gamo,^{54,56,57} ciervo mulo,⁵⁸ venado cola blanca⁵⁶ y reno^{59,60}); *Bovidae* (vaca,⁶¹ búfalo,⁶² borrego cimarrón,^{63,64} eland,^{56,62} rebeco⁵³); *Giraffidae* (jirafa⁶²), *Antilocapridae* (berrendo⁶⁵⁻⁶⁷); y *Camelidae* (camello⁶⁶), entre otros. El **cuadro 1** muestra la clasificación de las especies de pestivirus, así como su distribución y su principal hospedero,⁶⁸ mientras que el **cuadro 2** muestra los genotipos de pestivirus aislados a partir de animales silvestres.⁵²

Especies	Nombre del virus	Abreviación	Huésped	Distribución
Virus de la Enfermedad de las fronteras	Virus de la Enfermedad de las fronteras	BDV	Rumiantes	Todos los continentes
Virus de la Diarrea Viral Bovina 1	Virus de la Diarrea Viral Bovina 1	BVDV-1	Ungulados	Todos los continentes
Virus de la Diarrea Viral Bovina 2	Virus de la Diarrea Viral Bovina 2	BVDV-2	Ungulados	Todos los continentes
Virus de la Diarrea Viral Bovina 3	Virus Ho-Bi like	BVDV-3	Ganado bovino y búfalos de agua	América, Asia y Europa
Virus de la Fiebre Porcina Clásica	Virus de la Fiebre Porcina Clásica	CSFV	Cerdos	Todos los continentes
No asignado	Pestivirus atípico porcino	APPV	Cerdos	América, Europa y Asia
No asignado	Virus Bungowannah	BuPV	Cerdos	Australia
No asignado	Pestivirus de las jirafas	GiPV	Jirafas	África
No asignado	Pestivirus de la rata de Noruega	NrPV	Ratas	América
No asignado	Pestivirus del antílope Pronghorn	PAPV	Pronghorn Antílope	América
No asignado	Pestivirus affinis <i>Rhinolophus</i>	RaPestV	Murcielago (<i>Rhinolophus affinis</i>)	Asia
No asignado	Pestivirus Aydin/04/TR	ShPV-Aydin	Pequeños rumiantes	Euroasia
No asignado	Agente inductor neuro-degenerativo	LINDA virus	Cerdos	Austria

Cuadro 1. Clasificación de pestivirus, distribución y principal hospedero (Modificadod de Blome, S. *et al.* 2017).⁶⁸

Animal	Origen	Especie/genotipo/genogrupo
Cabra (<i>Sus Scrofa</i>)	Austria Austria, Alemania, Italia, República Checa Alemania, Italia, República Checa	CSFV 2.1 CSFV 2.2 CSFV 2.3
Búfalo (<i>Syncerus caffer</i>)	Alemania zoológico	BVDV-1
Eland (<i>Tragelaphus oryx</i>)	Zimbawe	BVDV-1
Bisonte canadiense (<i>Bison bison bison</i>)	Cánada	BVDV-1 a, BVDV-1b
Alpaca (<i>Lama pacos</i>)	UK, USA	BVDV-1b
Pudu (<i>Pudu Puda</i>)	Chile	BVDV-1b
Bongo (<i>Tragelaphus euryceros</i>)	Alemania zoológico	BVDV-1b
Deer (no específico)	Nueva Zelanda	BVDV-1c
Venado Roe (<i>Capreolus capreolus</i>)	Alemania	BVDV-1d
Venado ratón (<i>Tragulus javanicus</i>)	Dinamarca	BVDV-1f
Venado (no específico)	Gran Bretaña	BVDV-1j
Jirafa (<i>Girafa comelopardalis</i>)	Kenia	Genotipo jirafa
Reno (<i>Rangifer tarandus</i>)	Alemania zoológico	BDVB-2
Bisonte europeo (<i>Bison bonasus</i>)	Alemania zoológico	BDVB-2
Gamuza (<i>Rupicapra pyrenaica pyrenaica</i>)	Andorra	BDVB-4
Antilope Pronghorn	USA	Genotipo Pronghorn

Cuadro 2. Especies y genotipos de pestivirus aislados a partir de animales silvestres (Modificado Vilček, Š. *et al.* 2006).⁵²

1.2.2 Transmisión

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

Diversos factores, como los movimientos migratorios y el uso de praderas comunes, promueven la diseminación de pestivirus desde los animales domésticos hacia la fauna silvestre.⁶⁹

Algunos estudios sugieren que el cerdo silvestre podría tener un papel importante en la transmisión de fiebre porcina clásica hacia los cerdos domésticos.^{70,71} El CSFV se ha detectado en cerdos silvestres de Alemania, Italia, Austria, Rusia, República Checa, Eslovaquia,⁷⁰ Croacia,⁷² Francia⁷³ y Holanda.⁷⁴

La vía de entrada de los pestivirus es por la mucosa nasal o bucal, después del contacto directo con las secreciones de animales infectados (saliva, lágrimas, descargas nasales, leche, orina, heces y semen). La replicación viral ocurre en células epiteliales y en tonsilas palatinas en donde los linfocitos propagan el virus por todo el cuerpo.⁷⁵ La mayoría de las enfermedades son subclínicas. El periodo de incubación es de 3-7 días.

La presentación de la enfermedad depende del estado inmunológico de los animales, así como la presencia o ausencia de los animales persistentemente infectados. Las manifestaciones clínicas en cada individuo varían con la edad y el tiempo de gestación. Se tienen que considerar tres situaciones: la infección posnatal en ganado no gestante, infección en ganado gestante, presencia de persistentemente infectados y la enfermedad de las mucosas.

1.2.2.1 Infección posnatal en ganado no gestante:

El ganado de todas las edades es susceptible, pero la infección es más común en animales jóvenes. En animales que reciban anticuerpos por calostro la enfermedad desaparecerá a los 3 a 8 meses de edad, y los animales no muestran signos hasta que los anticuerpos calostrales. Una fiebre bifásica y leucopenia ocurren en ganado susceptible dentro de un periodo de incubación de 5-7 días después de la infección. Algunos animales en el ganado susceptible tienen diarreas explosivas, descarga nasal y ocular y desarrollarán erosiones o úlceras en los labios y la cavidad oral. Se puede presentar trombocitopenia que puede llevar a hemorragias

y muerte, debido a la inmunosupresión pueden llegarse a presentar enfermedades oportunistas en el tracto respiratorio y digestivo con una alta mortalidad.

1.2.2.2 Infección en ganado gestante

La infección transplacentaria del virus al feto ocurre comúnmente por adultos susceptibles durante la gestación, lo cual puede desarrollar diferentes resultados dependiendo de la edad (madurez inmunológica) del feto y las cepas del virus. La infección en etapas tempranas resulta en muerte y reabsorción embrionaria. La infección después del desarrollo de la competencia inmunológica en los días 100-125 resulta en una infección posnatal persistente o en lesiones en el feto y en un retraso en el desarrollo que ocasiona la muerte del feto o que nazca bajo de peso. Las lesiones fetales son en su mayoría manifestaciones del virus en la organogénesis que son evidentes, como defectos congénitos en el ojo (displasia retinal), sistema nervioso central (hipoplasia cerebelar, hidrocefalia) y otros como alopecia. El ganado que sobrevive que haya sido infectado *in utero* en la gestación temprana permanece como persistentemente infectados durante toda su vida. Estos animales nunca montan una respuesta inmunológica efectiva y tienen una infección persistente e inmunotolerante (mecanismo por el cual el sistema inmunitario previene la autorreactividad patológica contra los antígenos propios, lo que impide que surjan enfermedades autoinmunes). Tales animales que permanecen seronegativos en todas las pruebas tienen grandes cantidades de virus en todas las secreciones y transmiten la enfermedad a otros hospederos susceptibles con gran eficiencia, algunos fallan en persistir y otros desarrollan la enfermedad de las mucosas. Los fetos infectados después de los 125 días de gestación usualmente sobreviven y usualmente desarrollan anticuerpos que neutralizan el virus.

Durante la infección el virus invade el placentoma, se replica y puede infectar al feto sin producir lesión. En ovejas se ha observado el daño que produce el virus de la Diarrea Viral Bovina en el endotelio vascular del útero dentro de los primeros 10 días de infección y el resultado es desprendimiento celular que es ingerido por el trofoblasto fetal.⁷⁶

Los virus que se establecen en el momento de la organogénesis tienen la distinción de causar malformaciones que afecten permanentemente al animal. Existe evidencia que el biotipo no citopático puede replicarse en el feto, causando daño a determinados tejidos, pero no la muerte; la patogénesis de este amplio rango de lesiones es poco probable que se deba a un solo defecto. El virus tiene una preferencia por células que se encuentran activas mitóticamente, particularmente las células del sistema nervioso central y tejido linfoide.⁷⁶

1.2.2.3 Persistentemente infectados y la enfermedad de las mucosas

En ganado susceptible en donde el virus ha sido recientemente introducido, una gran parte de la población que nazca en la siguiente generación serán persistentemente infectados. La mortalidad es arriba del 50% en el primer año. La enfermedad de las mucosas solamente ocurre cuando dos biotipos están presentes y la signología puede ser fiebre, anorexia diarrea acuosa profusa, descarga nasal, estomatitis ulcerativa, deshidratación, emaciación finalmente la muerte.

Los pestivirus son capaces de inducir inmunotolerancia cuando los fetos son infectados *in utero* entre los 2 a 4 meses de gestación. Los animales PI presentan una viremia constante y son incapaces de producir anticuerpos contra el virus. Estos animales son aparentemente sanos o pueden desarrollar una gran variedad de signos incluyendo: poca ganancia de peso, pelo hirsuto, signología respiratoria, digestiva y neurológica.

1.2.2.4 Infecciones mixtas

Una complicación de infecciones agudas ocurre cuando existe una invasión del virus (principalmente el virus de Diarrea Viral Bovina) con otro patógeno. Se encuentra bien documentado que una infección mezclada del virus de Diarrea Viral Bovina con el virus de la Rinotraqueitis Bovina, el virus Sincitial Respiratorio o con *Pasteurella haemolytica* producen una infección más severa que si se encuentran estos patógenos de manera independiente. Es interesante mencionar que estas infecciones producen signología respiratoria, por lo tanto, no es sorpresa que el virus de la Diarrea Viral Bovina es un agente

presente en el complejo respiratorio del ganado. También se ha demostrado que si se encuentra presente el Virus de la Diarrea Viral Bovina junto con otros virus entéricos como rotavirus y coronavirus o *Salmonella* spp. exacerbaban la presentación entérica.⁷⁶

La base para la patogenia de las enfermedades mixtas parece ser la inmunosupresión consecuente de la leucopenia transitoria y posiblemente una disfunción de neutrófilos como consecuencia de una infección aguda. También se sugiere que el virus de la Diarrea Viral Bovina estimula la liberación de prostaglandinas de células sanguíneas mononucleares y estas disminuyen la blastogénesis de linfocitos.⁷⁶

La patología de estas infecciones mixtas depende del agente secundario. En el caso de *Pasteurella haemolytica* existe una neumonía fibrinopurulenta y pleuritis.

1.3 Inmunidad

El virus de Diarrea Viral Bovina produce una infección persistente en el feto durante su desarrollo intrauterino, es así como el virus establece una infección caracterizada por inmunotolerancia la cual es específica para la cepa viral infectante; los animales infectados durante este periodo pueden nacer y desarrollarse de manera normal, pero permanecen persistentemente infectados a lo largo de su vida.⁷⁷

El sistema inmune reacciona a una infección aguda mediante la formación de anticuerpos y la activación de linfocitos T (CD4+ y CD8+) que reconocen los diferentes tipos de vDVB. Se ha detectado la presencia de anticuerpos neutralizantes desde las primeras dos semanas después del primer contacto con el virus. Sin embargo, la cinética de linfoproliferación es diferente entre biotipos.⁷⁸

Como se ha mencionado con anterioridad, la infección con el biotipo NCP en animales gestantes antes del día 125 de gestación deriva en el establecimiento de una infección persistente. El requisito para tal infección persistente parece surgir de una inmunotolerancia de linfocitos T y B específicos.⁷⁹ La teoría es que existe una selección negativa o una regulación negativa de linfocitos B y T específicos de vDVB durante la ontogenia, resultando

en la ausencia de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes y células, mediadas por la inmunidad al vDVB persistente.⁸⁰

Sólo los biotipos NCP son capaces de establecer una infección persistente, mientras que la infección transitoria es causada por ambos biotipos. La diferencia entre el biotipo CP y el NCP es la inducción de interferón (IFN) tipo I en macrófagos. La ausencia de la inducción del IFN que se observa con el virus NCP, es una ventaja para el virus por la incapacidad para inducir apoptosis en células infectadas.⁸¹ Se ha demostrado que la proteína N^{pro} tiene la capacidad de inhibir la apoptosis inducida por virus ARN de doble cadena, además de activar la degradación proteasomal de IRF-3, previniendo la activación transcripcional del gen de IFN β ^{82,83,10}. La proteína N^{pro} posee además un motivo de unión al zinc, el cual es esencial para la interacción con IRF-7, reduciendo la expresión del IFN tipo I.⁸⁴

La proteína E^{ms} también desempeña una función en la inhibición de la inducción del interferon tipo I, pero ésta a diferencia de la proteína N^{pro}, lo hace en células no infectadas.⁷⁷ Adicionalmente, en infecciones *in vitro* de macrófagos con vDVB, éstos reducen la expresión de FcR y C3R por lo cual se disminuye su actividad fagocítica.⁸⁵

1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de pestivirus puede ser complejo debido a la demora entre la infección y la manifestación de los signos clínicos. Los animales con infección aguda secretan bajos niveles del virus, por un corto periodo de tiempo (7-10 días) sin embargo, los signos clínicos pueden presentarse posteriormente durante la viremia.⁸⁶

En casos con signología respiratoria o digestiva las muestras requeridas son hisopados nasales, conjuntivales y rectales. Para la detección de infecciones persistentes en machos reproductores, se requiere de muestras de semen colectadas en intervalos de 7 días en al menos en tres ocasiones.

1.4.1 Aislamiento viral

El primer paso en el diagnóstico es la detección del agente por lo que se puede realizar el aislamiento viral. El virus se aísla en cultivos de células de bovino derivadas de riñón, pulmón, testículo o cornetes nasales. En algunos casos también pueden utilizarse células de ovino, aunque primero debe evaluarse si estos cultivos se encuentran libres de contaminantes y si las células son susceptibles.

Debe considerarse que el biotipo no citopático del virus de diarrea viral bovina es un contaminante común en los cultivos celulares por lo que estos deben evaluarse con regularidad. El suero fetal bovino utilizado para el mantenimiento de los cultivos celulares también debe evaluarse para verificar que se encuentre libre no solo del virus, sino también de anticuerpos neutralizantes contra el virus.

Por estas razones, las muestras sugeridas para el aislamiento viral son capas leucoplaquetarias, sangre completa, leucocitos lavados o suero.⁸⁶

1.4.2 Detección del ARN viral

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) es una técnica que permite determinar la presencia del ácido nucleicos del virus. Deben elegirse iniciadores que permitan detectar regiones altamente conservadas del genoma, de preferencia la región 5' no traducible o bien, en la región NS3. Las muestras que pueden emplearse en esta prueba diagnóstica son: sangre completa, suero y demás secreciones del animal.⁸⁶

1.4.3 Inmuno ensayo enzimatico (ELISA)

La detección de antígenos de origen viral mediante la técnica de ELISA se utiliza para identificar individuos persistentemente infectados. La técnica utilizada para la detección del virus es el ELISA tipo sándwich, en donde se utiliza un anticuerpo de captura que se une en

la fase sólida y un anticuerpo detector que se conjuga con la peroxidasa. Se utilizan tanto anticuerpos monoclonales como policlonales para aumentar la sensibilidad de la prueba. Los antígenos que pueden ser detectados en la prueba son la NS2-3 y la E^{rns}. Las muestras que se utilizan son sangre completa, suero y plasma.⁸⁶

1.4.4 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realiza en tejido fijado en formalina y embebido en parafina. Es una técnica que permite la identificación de antígenos virales a través del uso de anticuerpos específicos marcados. Por lo general se utilizan anticuerpos unidos a peroxidasa aunque con anterioridad se utilizaba fluoresceína.⁸⁶

1.5 Vacunas

La vacunación es una estrategia común para prevenir pérdidas por infecciones con pestivirus en varios países a nivel mundial.⁸⁷ Actualmente se encuentran disponibles vacunas inactivadas y atenuadas.

En el caso de las vacunas atenuadas se llevan a cabo varios pases del virus en cultivos celulares, sin embargo, en el caso de los pestivirus no se tiene un buen indicador de atenuación debido a que estos no inducen signos significativos en el cultivo, por lo que el riesgo de volverse nuevamente virulentas se encuentra siempre presente.⁸⁸

Otro problema de gran importancia es que el uso de vacunas atenuadas en animales gestantes puede causar efectos adversos. Dependiendo del virus vacunal, puede producirse daño fetal, infecciones persistentes o abortos.⁸⁹ Esto ha llevado a una búsqueda para mejorar la atenuación de los pestivirus mediante mutaciones que afecten el genoma durante la replicación y la expresión de proteínas virales. El aumento en la eficiencia de infección o la modificación del tropismo del virus en el huésped natural pueden dirigir la atenuación. También se han identificado diferentes mutaciones que disminuyen la expresión de genes de los pestivirus. Una de ellas es la delección de N^{pro} que impiden la traducción de proteínas virales, inhibe la capacidad del virus para interferir en la respuesta del sistema inmune innato y reduce su tasa de replicación.¹³ La función de los IRES (Sitio interno de entrada al ribosoma) también puede ser modificada por mutaciones.⁹⁰

1.6 Pestivirus clásicos y emergentes

Los pestivirus emergentes tienen como reservorios en la mayoría de los casos, a animales de fauna silvestre, en los cuales producen signología respiratoria, digestiva, desórdenes hemorrágicos, abortos y enfermedades congénitas, además de pérdidas aproximadas de hasta 64 millones de dólares por año.⁹¹ Se ha observado que miembros del género Pestivirus son capaces de atravesar la barrera inter-especie.⁶⁸

1.6.1 Diarrea Viral Bovina y Enfermedad de las Mucosas

La diarrea viral bovina causa diferentes signos en los hospederos (Baker, 1987; Thiel et al., 1996). La enfermedad resulta de infecciones agudas, así como de síndromes seguidos de infecciones persistentes. En infecciones agudas, las propiedades del virus tienen una gran importancia para la severidad de la enfermedad. La mayoría de las infecciones agudas postnatales en rumiantes con diarrea viral bovina son inaparentes o acompañadas con solo algunos signos o pasan desapercibidas. Las manifestaciones clínicas son leucopenia, fiebre, diarrea, descarga nasal, tos y otros signos respiratorios. La importancia del brote es la inmunosupresión, lo que significa un gran riesgo de súper infecciones con otros virus o bacterias (Brackenbury et al., 2003).

La mayoría de los tejidos infectados con diarrea viral bovina provienen del sistema inmune. Un indicador de virulencia es el grado de agotamiento de las células encontradas en los linfonodos que se puede relacionar con la intensidad, duración de la linfopenia y la severidad de otros signos.

También el virus de la diarrea viral bovina puede producir el síndrome conocido como enfermedad de las mucosas. Esta es una enfermedad esporádica del ganado que afecta a animales de 6- 24 meses. Los signos más característicos son diarrea sanguinolenta, fiebre, anorexia, ataxia y debilidad. La mortalidad es de un 100%, la muerte ocurre 2 días después de que se presentan los signos. En la necropsia se encuentran lesiones a lo largo de todo el tracto digestivo, afectando principalmente la mucosa.

Los animales infectados con diarrea viral bovina y la enfermedad de las mucosas, se encuentran infectados por el mismo virus. La enfermedad de las mucosas se desarrolla en animales persistentemente infectados durante el primer tercio de la gestación, además de que los animales con esta enfermedad se infectan tanto de un virus citopático y uno no citopático.

1.6.2 Enfermedad de las fronteras

Fue observada por primera vez en la frontera de Inglaterra y Gales, afectando a ovejas, presentando los mismos signos que la diarrea viral bovina además de reducir los porcentajes de concepción dentro del ganado.¹⁷

1.6.3 Fiebre porcina clásica

Es una enfermedad que tiene una presentación aguda y subaguda hemorrágica con altos rangos de mortalidad. La variabilidad de los signos clínicos se atribuye a la virulencia de las diferentes cepas.¹⁷

La información disponible sobre virus emergentes en ungulados en México es escasa.¹ Se han identificado poblaciones de ciervos seropositivos al BVDV en algunas zonas del norte del país y de la península de Yucatán,⁹² así como la presencia del virus de enfermedad de las fronteras.¹ La prevalencia de otros pestivirus típicos y emergentes en México se desconoce actualmente.

1.6.4 Virus mucosal de las jirafas

El pestivirus de las jirafas fue asociado a un brote de una enfermedad que produce lesiones mucosales en jirafas en Nanyuki, Kenia en 1967.^{93,94} Se ha demostrado que este virus difiere de los pestivirus clásicos. Se aisló un virus altamente relacionado de un cultivo celular de bovinos en 1990. El conocimiento acerca del hospedero natural, la virulencia y la distribución geográfica se desconoce hasta el momento.⁹⁵

1.6.5 Virus Pronghorn

En 2005 un nuevo pestivirus fue encontrado en un berrendo (*Antilocapra americana*).⁹⁶ El animal afectado fue un antílope joven que se encontró ciego. El diagnóstico demostró neutralización cruzada con el género *pestivirus*. Basados en una secuenciación parcial (los primeros análisis filogenéticos se llevaron a cabo en la región 5'UTR, en la N^{pro} y en la región E2) se demostró que el respectivo virus diverge de los clásicos, pero comparte la región conservada 5'UTR y una zona conservada en N^{pro}.⁶⁸

1.6.6 Pestivirus de Túnez en ovejas

Análisis genéticos recientes de muestras de ovinos demostraron la presencia de un nuevo grupo de pestivirus. El primer miembro de este virus fue aislado de un lote de vacunas de pestivirus contaminadas. Basados en la región 5'UTR y N^{pro}-E2, se demostró que diverge con el virus de la diarrea viral bovina en un 36.5% -40% y con el virus de la fiebre porcina clásica en un 32.8% -35.1%.⁹⁷ Estudios demuestran la presencia de este virus en el norte de África, Italia y Francia.⁹⁸

1.6.7 Pestivirus tipo HoBi

Fue descrito por primera vez en 2004 en un suero fetal bovino originario de Brasil y su nombre deriva del aislamiento inicial "HoBi_D32/00".⁹⁹ Después de la descripción inicial, virus similares fueron detectados y denominados tipo HoBi, pestivirus atípicos o bien, Virus de la diarrea bovina 3, existe cierta resistencia a clasificarlo dentro de los virus de diarrea debido a que se encuentra genéticamente distante a los otros dos genotipos y el diagnóstico y las vacunas contra el genotipo 1 y 2 no son efectivos. La presencia de varios sueros afectados en América del sur indica que el virus probablemente se diseminó en esta región. También se ha encontrado material contaminado con este virus proveniente de países como Australia, Canadá, México, Estados Unidos, el sur de Asia e Italia.

La primera evidencia de una infección natural con el virus de *HoBi-Like* se encontró en búfalos de agua de origen brasileño, en los 90`s, pero el brote no ha sido reportado oficialmente.¹⁰⁰

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad incluye fiebre (39.4-40.1°C), tos, descarga nasal mucopurulenta, leucopenía, conjuntivitis, pulso y respiración aceleradas, también existe signología reproductiva como abortos entre los 4-6 meses de gestación. En la necropsia se encuentra una traqueitis severa y bronconeumonía en los lóbulos apicales.¹⁰⁰

No existe evidencia experimental que el virus afecte a otros animales además de bovinos domésticos y búfalos de agua.¹⁰⁰

1.6.8 Virus Bungowannah

En 2003 un brote de “Síndrome miocárdico en cerdo” en cerdos recién nacidos en Australia fue reportado. El virus se diseminó de la granja y los cerdos sobrevivientes desarrollaron inmunidad con brotes esporádicos de esta. Al inocular cerdos *in utero* y su posterior secuenciación se demostró la presencia de un nuevo virus llamado Bungowannah. Al encontrarse las regiones conservadas 5'UTR y la N^{pro} se le clasificó en el género *Pestivirus*.

Como se puede observar en la figura 4 la cercanía de los pestivirus representada en un árbol filogenético. Los pestivirus clásicos se encuentran en negro, los pestivirus atípicos detectados en su mayoría en 2010 se encuentran en azul y los aislados desde 2010 se muestran en rojo.

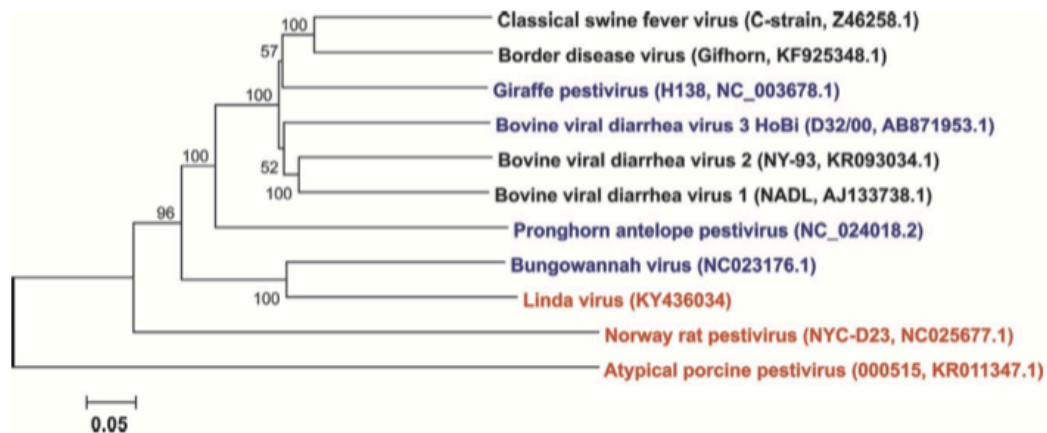


Figura 4. Árbol filogenético basado en secuencias del genoma completo de pestivirus representativos. Tautz. N. et al. (2015) “The molecular Biology of Pestivirus”. Advances in Virus Reserch, volume 93.pp 77-160

En este trabajo se propone identificar la presencia de pestivirus en México a partir de muestras de suero de ungulados silvestres en cautiverio, mediante el uso de técnicas moleculares, así como realizar su genotipificación con programas bioinformáticos y su aislamiento en cultivo celular para determinar las cepas prevalentes en las poblaciones evaluadas.

Las secuencias de las regiones amplificadas mediante RT-PCR se muestran a continuación en la figura 5.

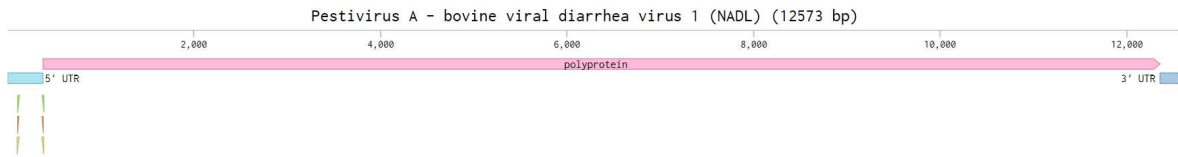
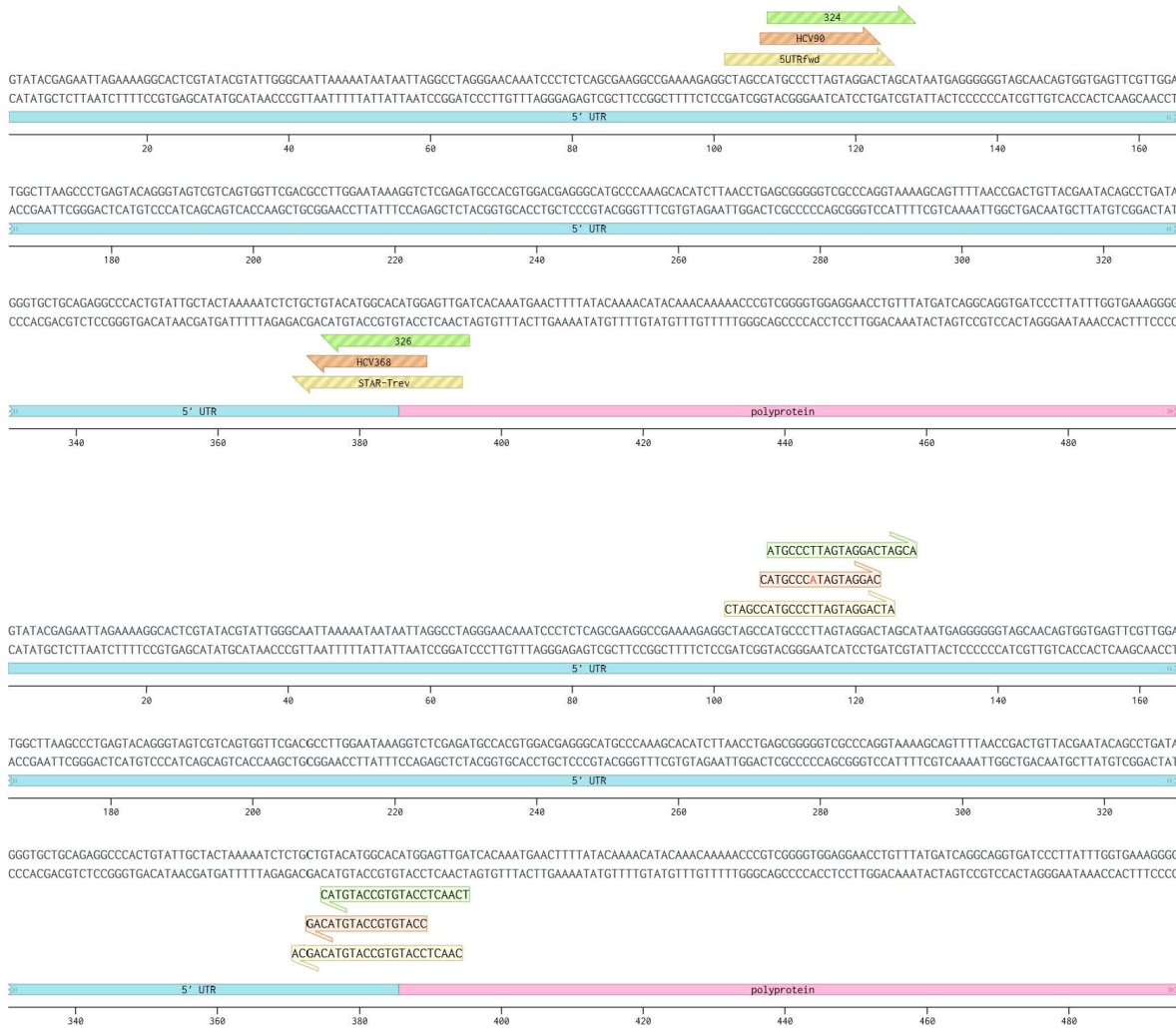


Figura 5A. Diagrama del genoma del *Pestivirus A*.



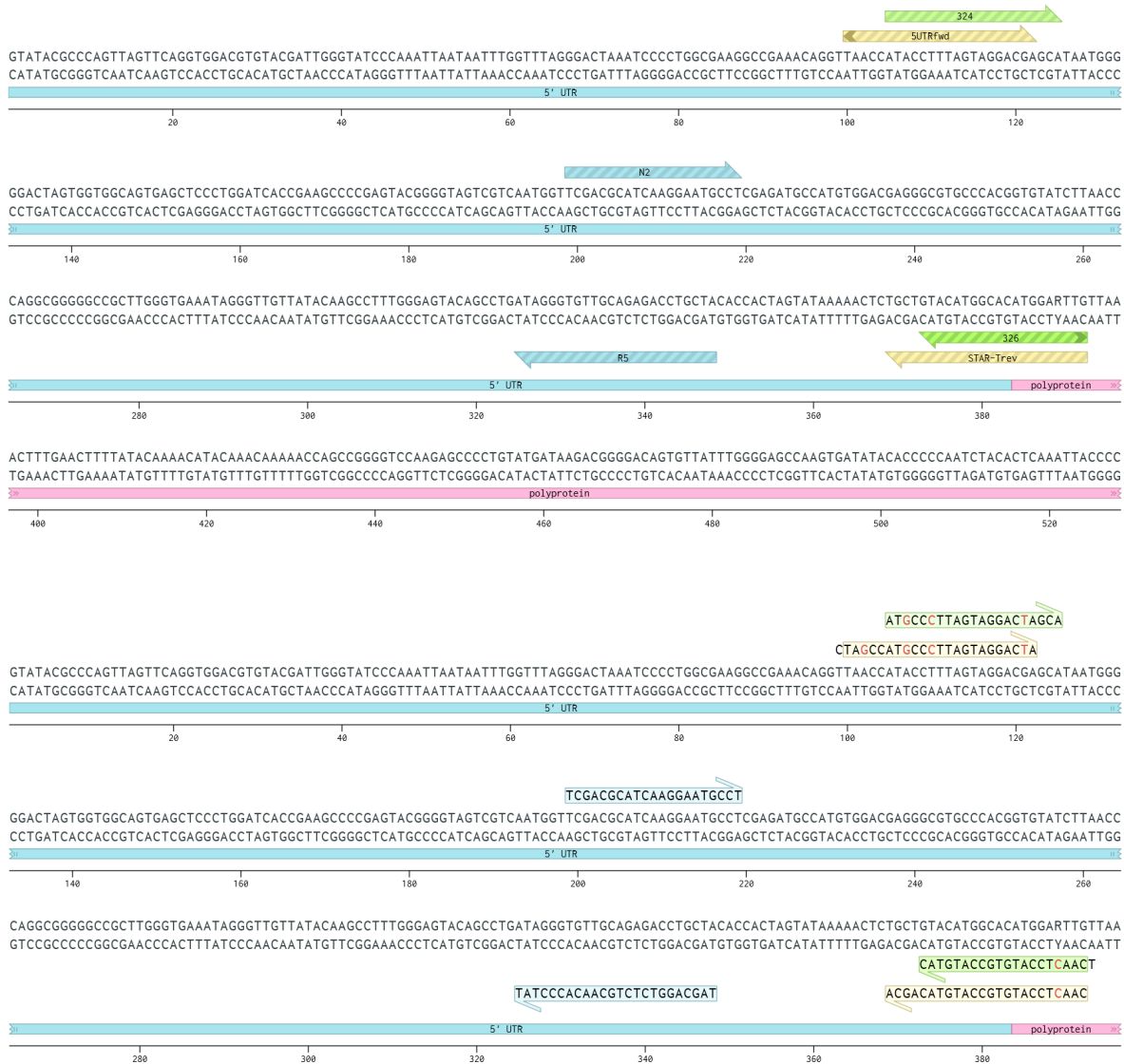


Figura 5B. Secuencias de las regiones del genoma del *Pestivirus A* amplificadas mediante RT-PCR.

5' UTR (cian), poliproteína (rosa), 3' UTR (azul), iniciadores 324 y 326 (verde), iniciadores HCV90 y HCV368 (naranja), iniciadores 5UTRfwd y STAR-Trev (amarillo).

2. Justificación

Actualmente existe escasa información sobre la circulación de pestivirus en animales silvestres en México. Al considerar que estos virus pueden transmitirse entre ungulados domésticos y silvestres, se propone realizar la genotipificación de pestivirus para conocer su distribución en algunas poblaciones silvestres de nuestro país.

3. Hipótesis

Los pestivirus clásicos y emergentes se encuentran circulando en ungulados silvestres del orden *Artiodactyla* en cautiverio en México.

4. Objetivo

4.1 Objetivo general

Detectar y genotipificar a miembros del género *Pestivirus* a partir de muestras de suero obtenidas de ungulados silvestres en cautiverio del orden *Artiodactyla*, mediante el uso de técnicas moleculares y programas bioinformáticos para determinar los genotipos prevalentes en las poblaciones evaluadas.

4.2 Objetivos específicos

- Detectar e identificar a la región región 5' no traducible (5'UTR) de los pestivirus mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) a partir de muestras de suero obtenidas de ungulados silvestres en cautiverio del orden *Artiodactyla*.
- Aislar a los virus presentes en las muestras positivas mediante la infección de cultivos celulares para identificar a los biotipos circulantes.

5. Material y métodos

5.1 Cepa de referencia

Se utilizó la cepa del vDVB NADL como testigo positivo para las RT-PCR.

Para replicar la cepa de referencia NADL y NYC se infectaron monoestratos de la línea celular MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) sin medio de crecimiento contenidas en botellas de 75 cm² con un 80% de confluencia. Una vez inoculadas las botellas se incubaron a 37°C en agitación por una hora; después de transcurrido el tiempo de incubación se decantó el inóculo y se adicionó 20 ml de medio fresco Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) con 7% de L-glutamina, 10% de antibiótico 10% de Suero equino.

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

5.1.1 Titulación de la cepa viral de referencia

El título de la cepa NADL del virus de DVB se determinó en cultivo de células MDBK. Las células se desprendieron de las botellas del cultivo celular por medio del uso de tripsina y posteriormente se cultivaron en placas de 96 pozos con aproximadamente 20 000 células contenidas en 50 µL de MEM suplementado por cada pozo. Brevemente, se realizaron 8 alícuotas de 900 µL de MEM suplementado. Se hicieron diluciones decuples seriadas al adicionar a la primer alícuota 100 µl de la cepa viral a titular y se homogeneizó con el uso de una pipeta automática. Posteriormente, de dicha suspensión viral se tomaron 100 µL y se transfirieron a la segunda alícuota, después se repitió este paso hasta llegar a una dilución final de 10⁻⁸. En la fila A de la placa se llenaron los primeros 5 pozos con 100 µl de la dilución 10⁻¹; en la fila B se llenaron 5 pozos con 100 µl de la dilución 10⁻². A partir de la fila C hasta la fila H se repitieron los mismos pasos con la correspondiente dilución.

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

El título de cada cepa viral se determinó utilizando la fórmula de Reed- Muench:

$$\text{Título} = \frac{\%>50\% - \%<50\%}{\%>50\% - \%<50\%} \times \log \text{ del factor de dilución} + \log \text{ de la dilución } \%>50\%$$

5.2 Muestras de trabajo (suero)

Las muestras utilizadas fueron 5 ml de suero de ungulados silvestres de diversas regiones de México como se muestra a continuación en el Cuadro 3.

Región de origen	Número de muestra
Achotal, Veracruz	26
Mil Aguas, Veracruz	27
Acayucan, Veracruz	239
Zoológico de Chapultepec, Ciudad de México	51
Tequisquiapan, Querétaro	17
Zacango, Estado de México	11

Cuadro 3. Resumen de muestras de suero

5.3 Muestras de trabajo (plasma)

De la misma manera que los sueros, también se procesaron muestras de plasma procedentes de ungulados silvestres de las mismas regiones.

Región de origen	Número de muestras
Zoológico de Chapultepec, Ciudad de México	53

Tequisquiapan, Querétaro	17
Zacango, Estado de México	11

Cuadro 4. Resumen de muestras tomadas de plasma.

5.3.1 Obtención de muestras sanguíneas

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

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

Para la separación de plasma y capa flogística se utilizó Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para cada muestra, en tubos estériles de 15 ml se adicionó 3.5 ml de Histopaque®-1077, posteriormente de manera cuidadosa se sobrepuso 6.5 ml de la sangre completa y se centrifugó a 700 g por 30 min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación se pudo visualizar la formación de capas; la capa de interés fue la opaca, la cual contiene los linfocitos. Con mucho cuidado, con una pipeta automática se tomó la capa de linfocitos y se transfirió a un tubo estéril de 2 ml y se centrifugó a 200 g por 10 min, desechando el sobrenadante. La capa flogística se lavó 1 vez con PBS estéril, se desechó nuevamente el sobrenadante y después se reconstituyó la capa flogística con 500 µl de PBS y se mantuvo a -80°C hasta su uso.

5.3.2 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total a partir de muestras de suero se realizó mediante el método de tiocinato de guanidina o con el reactivo TRIzol®. El protocolo empleado para el reactivo TRIzol® se resume a continuación:

El procedimiento se realizó a 4°C en la campana de flujo laminar. Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente. Se agregó 900 µl de reactivo TRIzol® por cada 400 µl de suero. La mezcla se homogenizó por agitación durante 10 s con un equipo Vortex Mixer (modelo VM-1000) y se incubó a 4°C durante 5 min. Se añadieron 240 µl de cloroformo, se homogenizó por agitación durante 10 s y se incubó a 4°C durante 5 minutos. Tras centrifugar a 4°C y 13,000 rpm durante 15 min, se transfirió el sobrenadante (ARN) a otro microtubo y se mezcló con 600 µl de isopropanol al 100%. La mezcla se homogenizó por agitación durante 10 s y se incubó a -20°C durante 1 hora. Después se centrifugó a 4°C a 13 500 rpm durante 15 min y se decantó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 75 %, el cual fue preparado previamente con agua tratada con DEPC. El sedimento se homogenizó por agitación durante 10 s y se centrifugó a 4°C y 13000 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se eliminó el exceso de etanol al dejar secar la pastilla de ARN durante 5 min con el microtubo destapado e invertido en posición vertical. El ARN total se suspendió en 20 µl de agua ultrapura, se cuantificó y se almacenó a -70°C, hasta el momento de su uso. Se determinó la integridad y pureza de ARN total obtenido mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa.

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

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

Iniciador	Sentido	Secuencia	Tamaño (pb)	Autor
324	Forward	ATGCCCATAGTAGGACTAGCA	288	Vilcek <i>et al.</i> , 1994
326	Reverse	TCAACTCCATGTGCCATGTAC		
HCV90	Forward	CCATGTGCCATGTACAG	278	Ridpath <i>et al.</i> , 1994
HCV368	Reverse	CATGCCCATAGTAGGAC		
5UTRfwd	Forward	CTAGCCATGCCCTTAGTAGGACTA	292	Mahony <i>et al.</i> , 2005
STAR-Trev	Reverse	CAACTCCATGTGCCATGTACAGCA		

Para la reacción de RT-PCR utilizando los iniciadores 324/326, HCV90/368 y 5UTR fwd/STAR-Trev se utilizaron los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer Cl ₂ Mg ⁺	5X	1X
dNTP's	10mM	200µM
M-MLV (Invitrogen)	200U/µl	50U
Iniciador sentido	20µM	0.2 µM
Iniciador antisentido	20µM	0.2 µM
Taq polimerasa (Roche)	5U/µl	2.5U/reacción
Agua	-	c.b.p. 100 µl
Volumen final	100 µl	

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

324 326	HCV90 HCV368	5UTRfwd STAR-Trev	N2 R5
94°C; 4 min	94°C; 4 min	94°C; 4 min	94°C; 4 min
94°C; 30 s	94°C; 30 s	94°C; 30 s	94°C; 30 s
55°C; 30 s	50°C; 30 s	56.2°C; 30 s	55°C; 30 s
72°C; 30 s	72°C; 30 s	72°C; 30 s	72°C; 30 s
72°C; 10 min	72°C; 10 min	72°C; 10 min	72°C; 10 min

Nota: 30 ciclos.

5.4 Secuenciación

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

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

5.5 Construcción y análisis filogenético

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron alineadas utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), disponible en el software Bioedit (Hall, 1999). El análisis filogenético se llevó a cabo usando el software MEGA 7 (Tamura *et al.*, 2013), para el cual se consideraron los siguientes parámetros:

Como modelo de sustitución nucleotídica se utilizó el método Kimura de dos parámetros (Kimura, 1980) elegido con base en el valor obtenido por el criterio de información bayesiana. Como método de reconstrucción filogenética se utilizó el método de Máxima Verosimilitud (Guindon y Gascuel, 2003), como método de soporte estadístico se utilizaron 1000 réplicas de bootstraps (Felsenstein, 1985).

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

5.6 Aislamiento viral

El aislamiento de las muestras de suero positivas se llevo a cabo en células MDBK con medio MEM y suero equino al 5%.

De un frasco de cultivo celular de 25 cm² se realizó la tripsinización de las células con 1 microlitro para enjuagar y 1 ml para desprender las células, se dejó actuar la tripsina por 5 minutos, posteriormente y se colocaron 3 mililitros de medio en el frasco, en un tubo falcón se homogenizan y se depositan 2 ml de esas células y se le añadió 23 ml de medio MEM y se homogenizó varias veces. Posteriormente se tomó 1 ml y se deposita en un pozo de una caja de cultivo de 24 pozos. Se dejó en la incubadora de cultivo celular a una temperatura de 37°C y con 5% de CO₂ durante 2 días.

Se realizó posteriormente la infección con las muestras positivas, el control citopático (NADL) y el no citopático (NYC). Se quitaron 950 µl de los 1000 µl de cada pozo de la placa de 24 pozos y se le agregó 100 µl de la muestra y los controles, se puso 1 hora en agitación cubierto de la luz y para finalizar se le agregan nuevamente 950 µl de MEM con suero equino

al 5% y se dejan en la incubadora de cultivo con una temperatura de 37°C y con 5% de CO₂ durante 2 días.

5.6.1 Titulación del aislamiento

El título del aislamiento de las muestras positivas se determinó en cultivo de células MDBK.

LA metodología se puede consultar en 5.1.1

Para cada cepa este ensayo se realizó por triplicado y se realizaron los mismos pasos con la cepa control citopática NADL; las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ u se incubaron por 5 días.

El título de la muestra positiva se determinó utilizando la fórmula de Reed- Muench:

$$\text{Título} = \frac{\%>50\% - 50}{\%>50\% - \%<50\%} \times \log \text{ del factor de dilución} + \log \text{ de la dilución } \%>50\% .$$

6. Resultados

6.1 Título de la cepa viral

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

Cepa de referencia	Título
NADL	1.5 x 10 ⁶ TCID/100 µl

Cuadro 5. Título obtenido de la cepa de referencia.

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

Los resultados obtenidos de la RT-PCR utilizando los tres juegos de iniciadores se muestran resumidos en el cuadro 6.

Región	VIL	HCV	Mahony	Total
Achotal, Veracruz	0	0	0	0
Mil Aguas, Veracruz	1	0	1	2
Zoológico de Chapultepec Ciudad de México	1	0	0	1
Tequisquiapan, Querétaro	0	0	0	0
Zacango, Estado de México	0	0	0	0
Acayucan, Veracruz	0	0	0	0

Cuadro 6. Resumen del número de muestras positivas a pestivirus por RT-PCR a partir de muestras de suero.

6.3 Análisis filogenético de muestras de suero

La construcción del árbol filogenético se realizó a partir de un fragmento obtenido de la región 5' UTR utilizando las muestras positivas y las secuencias de referencia disponibles en el GenBank.

El árbol filogenético muestra los clados correspondientes al vDVB 1, vDVB 2, HoBi-like, virus de la Enfermedad de las Fronteras, virus de la Fiebre Porcina Clásica y el virus de Pronghorn. El 100 % de las secuencias obtenidas en este trabajo se agruparon dentro del clado que incluía secuencias del vDVB-1, el cual a su vez se subdividió en 3 clados pertenecientes a los subgrupos vDVB-1a, vDBV-1b y vDBV-1c; siendo en vDVB-1b con el que las secuencias obtenidas del estudio mostraron mayor asociación como se muestra en la figura 6. Ninguna de las secuencias se agrupó en los otros subgrupos.

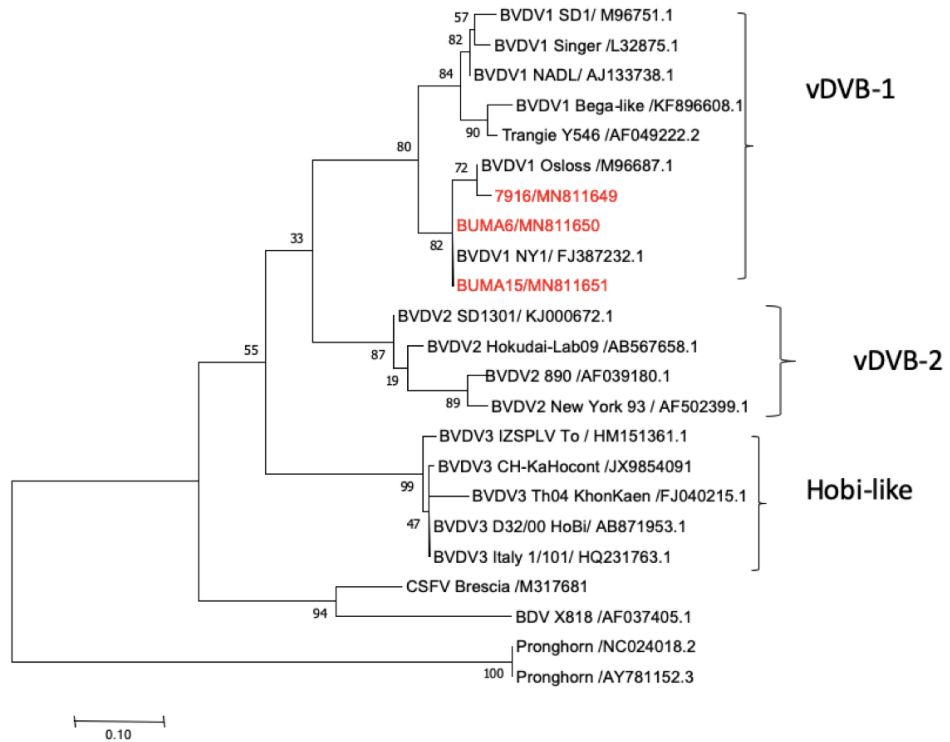


Figura 6. Analisis filogenético de pestivirus basados en la región 5' UTR. El árbol fue construido con el método de máxima verosimilitud utilizando un fragmento de 243 nucleótidos de un fragmento de la región 5'UTR . Se utilizaron las secuencias obtenidas en este trabajo (rojo) y cepas de referencia obtenidas del *GenBank*. Los números sobre los nodos representan el valor del bootstrap.

6.4 Aislamiento viral

De las muestras positivas, solo de la muestra 7916 que pertenece a un venado gamo del zoológico de Chapultepec se logró aislar como un biotipo citopático, produciendo vacuolización y lisis en las células MDBK.

6.4.1 Título de las muestras positivas

Posterior a los 5 días de inoculación se determinó el título de la muestra 7916 al observar vacuolización como efecto citopático. El título se presenta en el cuadro 7:

Muestra	Título
7916	10^6 DICC _{50%} /1 ml

Cuadro 7. Título obtenido de la muestra de suero de un venado gamo 7916.

7. Discusión

El análisis de los fragmentos de ácidos nucleicos virales secuenciados que se obtuvieron a partir de los amplificadores por RT-PCR de sueros de búfalos y venados demostró una alta identidad con el genotipo 1b del virus de la Diarrea Viral Bovina. De las muestras positivas totales el 100% fueron clasificadas como vDVB-1b.

Los resultados obtenidos muestran la presencia de un subgenotipo del virus de la Diarrea Viral Bovina similar a lo encontrado en otros trabajos como el de Gómez Romero *et al.* donde se logró identificar los genotipos 1a y 1b. En países como Australia el subgenotipo 1b (Evans *et al.* 2018) es el que se encuentra con mayor frecuencia en los animales de fauna silvestre como los artiodáctilos muestreados en este estudio, en contraste con lo informado en Estados Unidos, donde las variantes 1a y 1b se han establecido como los subgenotipos predominantes (Ridpath *et al.* 1994). También coincide con lo encontrado en Estados Unidos y Canadá donde las principales variantes en ciervos son el 1a y 1b (Ridpath, 2016).

Los cambios genéticos en los genomas de los pestivirus resultan de tres procesos diferentes (1) La acumulación de mutaciones puntuales resultando de la naturaleza de los virus ARN donde se tiene una ARN polimerasa dependiente de ARN, (2) recombinaciones no homologas de ARN y (3) recombinaciones homologas de ARN. Asumiendo que la tasa de mutación de los pestivirus es similar a la tasa reportada para otros virus ARN, se puede estimar que se introduce una mutación puntual en el genoma de estos por ciclo de replicación. Para el virus de Diarrea Viral Bovina 1 se han publicado diferentes tasas de mutación como por ejemplo 9.3×10^{-3} sustituciones/por sitio/por año en las secuencias de la región 5'UTR (Kadir,2019).

Por otro lado, se ha demostrado la recombinación entre 61 secuencias de genoma completo del virus de Diarrea Viral Bovina 1 y que la recombinación entre virus de DVB no es rara y puede ocurrir entre virus pertenecientes al mismo subgenotipo o en diferentes subgenotipos. La recombinación puede suceder entre miembros de las diferentes especies DVB 1 y DVB 2. La existencia de diferentes pestivirus recombinantes representa un desafío para el análisis filogenético y la clasificación de los aislamientos, se ha concluido que la genotipificación de los pestivirus no debe basarse en el análisis de un fragmento genómico único (Kadir, 2019).

Mientras que la recombinación no homologa es el mecanismo más utilizado para la generación de biotipos citopáticos, el creciente número de subgenotipos de DVB es el resultado de mutaciones puntuales acumuladas durante el tiempo, también conocido como deriva génica(drift). En adición las recombinaciones homologas contribuyen a la diversidad genética del virus de la DVB (Kadir,2019).

Diferentes regiones como la región 5'UTR, N^{pro}, E2 NS2-3 y NS5B-3'UTR han sido utilizadas para la genotipificación y clasificación del virus de la DVB y otros pestivirus. Secuencias parciales de la región 5'UTR son las más frecuentemente utilizadas, como fue el caso de este trabajo. El análisis con la región 5'UTR permite una correcta asignación de las muestras para determinar las especies de pestivirus y en muchos casos permite la definición de subgenotipos. En general las secuencias utilizadas de estas regiones permiten la comparación con otras cepas virales solamente si existen secuencias ya antes reportadas de la misma región (Kadir,2019).

Los hallazgos encontrados en el presente estudio podrían estar asociados al contacto entre los animales domésticos y los silvestres como anteriormente ha sido reportado, en donde se describe un contacto de hasta 19 especies diferentes de ungulados que se pueden ver afectadas por el tipo de hacinamiento en donde se encuentran, lo que puede favorecer el contacto en praderas y bebederos, en donde la principal infección que es transmitida es el virus de la Diarrea Viral Bovina (Rajeev et al. 2017).

Aunque la información es escasa, se ha demostrado previamente que estos virus tienen una amplia gama de huéspedes en animales de fauna silvestre y una vez que son infectados con el virus, estos animales son capaces de transmitir la infección (Ridpath, 2016).

La detección del virus de la Diarrea Viral Bovina en animales de fauna silvestre en cautiverio es un hallazgo importante ya que es un virus que no ha sido detectado en este tipo de animales con anterioridad en nuestro país, quedando demostrado que se puede estar presente en animales silvestres.

La información generada en este tipo de estudios contribuye a tener un mejor panorama y entendimiento en los aspectos de diversidad y epidemiología de los *Pestivirus*. De la misma manera la caracterización de nuevos *Pestivirus* puede contribuir a un mejor entendimiento de la evolución molecular de dichos patógenos (Vilceck et al. 2005) y de su situación epidemiológica en el país. También al conocer la variabilidad genética de los virus de la Diarrea Viral Bovina ayuda para clasificarlos de una mejor manera, así como en el diagnóstico y en un mejor desarrollo de vacunas (Vilceck et al. 2000).

Las muestras positivas al virus de la diarrea viral bovina fueron aproximadamente el 1% correspondiendo a lo previamente reportado en la literatura en animales de fauna silvestre como lo que se encontró en 2018 por Evans *et al.* en alpacas o Ricci *et al.* en 2019 en diferentes ungulados. Al tener una baja densidad de población entre los animales muestreados es el porcentaje que se esperaría encontrar de los pestivirus circulando en estos animales.

De acuerdo con lo encontrado en el aislamiento en la muestra de suero 7916 de un venado gamo se encontró el biotipo citopático correspondiente a la cepa Osloss que es citopática en las células de riñón de bovino (MDBK) y que fue aislada por primera vez por el Dr. Liess

(Renard, 1987). La severidad de la infección *in vitro* no está relacionada con lo que sucede en el animal, esto está todavía pendiente por elucidarse (Bendfeldt et al. 2007). El biotipo citopático difiere del no citopático a nivel molecular por la escisión de la proteína no estructural NS2/3 en la NS2 y NS3 con 53 y 80 kDa respectivamente. La escisión de la NS2/3 está relacionada con alteraciones en el genoma en la secuencia que codifica para esa proteína. Estas alteraciones están caracterizadas por duplicaciones, rearrreglos, inserciones de secuencias celulares y en algunos casos por mutaciones puntuales (Kummerer y Meyers 2000, Vilcek et al 2000). Los biotipos citopáticos generalmente tienen una proteína similar a la ubiquitina (Rinck et al. 2001). De acuerdo con la literatura los virus no citopáticos son los más frecuentes en el campo (Fulton et al. 2005). Los biotipos citopáticos se consideran poco relevantes dentro de la evolución del virus de la Diarrea Viral Bovina ya que no pueden establecer una cadena de infección y no causan la presentación de animales persistentemente infectados, pero al existir una coinfección de un biotipo no citopático con uno citopático se puede dar la presentación clínica de la Enfermedad de las mucosas (Peterhan et al. 2010).

La proteína no estructural NS3 no puede sintetizarse en células infectadas con el virus no citopático ya que es un precursor, La proteína NS2-3 no es procesada proteolíticamente. En contraste la NS3 es sintetizada en células infectadas con el biotipo citopático ya que la recombinación en virus ARN le añade un sitio extra de escisión en la proteína viral precisamente en el sitio N terminal de la proteína NS3. Este sitio de escisión puede ser creado de múltiples formas, una de las más frecuentes es la inserción de una proteína similar a la ubiquitina, que tiene como blanco proteínas celulares para su degradación. La inserción de la ubiquitina en el sitio N terminal de la NS3 permite la escisión de la NS2-3 por un miembro de la familia de las proteasas celulares. Esta recombinación le confiere una ventaja selectiva ya que les permite una mayor distribución a los biotipos no citopáticos (Fields).

Esta inserción dentro de la NS2-3 en el gen de la cepa Osloss obviamente no impide la producción de partículas virales infecciosas (Peterhans et al. 2010).

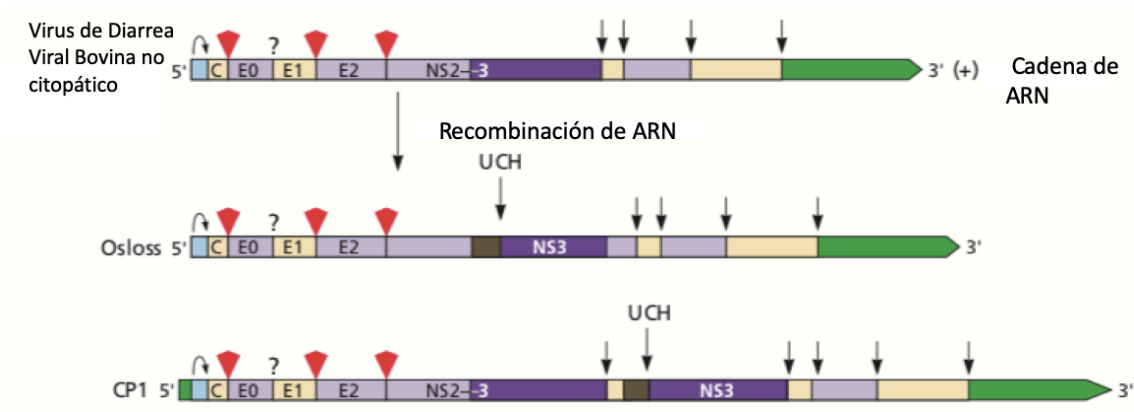


Figura 7. Posibles sitios de inserción de la secuencia de ubiquitina en el genoma de el Virus de la diarrea viral bovina. imagen modificada de Fields Virology

Como se observa en la figura 6 se muestran los diagramas del genoma de dos virus citopáticos (Osloss y CP), en los cuales la secuencia de ubiquitina (UCH por sus siglas en inglés) han sido insertadas en diferentes sitios. En Osloss, la UCH ha sido insertada en el precursor de la NS2-3; lo que ocasiona la escisión de la proteína NS3. En CP1 ha sucedido una duplicación tanto que se observa una copia adicional de NS3 que se encuentra presente después de la secuencia de UCH.

8. Conclusiones

- Se encontró evidencia de la presencia de ácidos nucleicos de pestivirus en aproximadamente el 1 % de las muestras analizadas.
- El análisis de secuencias demostró que los virus identificados corresponden al subgenotipo 1b del vDVB
- No se detectó la presencia de otros pestivirus en las muestras analizadas.
- Se aisló un vDVB citopático a partir del suero de un venado gamo.
- Se evidenció por primera vez la presencia de DVB en ungulados silvestres en cautiverio en México.

9. Prospectiva

- Aislar el virus de DVB detectado en otras muestras positivas.
- Realizar el muestreo en una mayor densidad de poblaciones de ungulados silvestres en cautiverio así como de animales silvestres.
- Diseñar iniciadores para detectar la región que codifica la proteína NS5B de pestivirus típicos y atípicos.
- Realizar monitoreos continuos de las poblaciones de fauna silvestre con el fin de detectar nuevas variantes genéticas de pestivirus.

10. Anexos

Anexo I

IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS

Mil Aguas, Veracruz

Identificación	Edad	Sexo	Especie
7	6 meses	H	Búfalo de agua
4	6 meses	H	Búfalo de agua
15	6 meses	H	Búfalo de agua
12	6 meses	H	Búfalo de agua
21	6 meses	H	Búfalo de agua
18	6 meses	H	Búfalo de agua
21	6 meses	H	Búfalo de agua
4	6 meses	H	Búfalo de agua
4	6 meses	H	Búfalo de agua
11	6 meses	H	Búfalo de agua
6	6 meses	H	Búfalo de agua
2	6 meses	H	Búfalo de agua
13	6 meses	H	Búfalo de agua
16	6 meses	H	Búfalo de agua
14	6 meses	H	Búfalo de agua
20	6 meses	H	Búfalo de agua
17	6 meses	H	Búfalo de agua
9	6 meses	H	Búfalo de agua
19	6 meses	H	Búfalo de agua
5	6 meses	H	Búfalo de agua
3	6 meses	H	Búfalo de agua

10	6 meses	H	Búfalo de agua
22	6 meses	H	Búfalo de agua
18	6 meses	H	Búfalo de agua
17	6 meses	H	Búfalo de agua
8	6 meses	H	Búfalo de agua
1	Bucorro	H	Búfalo de agua

Achotal, Veracruz

Identificación	Edad	Sexo	Especie
1529	3 años	H	Búfalo de agua
4	6 meses	H	Búfalo de agua
1	6 meses	H	Búfalo de agua
9	6 meses	H	Búfalo de agua
2	6 meses	H	Búfalo de agua
13	6 meses	H	Búfalo de agua
11	6 meses	H	Búfalo de agua
17	6 meses	H	Búfalo de agua
144	6 meses	H	Búfalo de agua
10	3 años	H	Búfalo de agua
19	6 meses	H	Búfalo de agua
297	3 años	H	Búfalo de agua
6	6 meses	H	Búfalo de agua
3	6 meses	H	Búfalo de agua
18	6 meses	H	Búfalo de agua
152	6 meses	H	Búfalo de agua
12	6 meses	H	Búfalo de agua
7	6 meses	H	Búfalo de agua
176	3 años	H	Búfalo de agua

15	6 meses	H	Búfalo de agua
13	3 años	H	Búfalo de agua
14	6 meses	H	Búfalo de agua
4	6 meses	H	Búfalo de agua
20	6 meses	H	Búfalo de agua
16	6 meses	H	Búfalo de agua
2178	3 años	H	Búfalo de agua
8	6 meses	H	Búfalo de agua

Zoológico de Chapultepec, Ciudad de México

Identificación	Edad	Sexo	Especie
8174	2 años	H	Gamo
557338784	2 años	H	Gamo
7451	2 años	H	Gamo
900252	2 años	H	Gamo
1353	2 años	H	Gamo
1355	2 años	H	Gamo
7924	2 años	H	Gamo
6407	2 años	H	Gamo
536	2 años	H	Sika
330308	2 años	H	Gamo
846	2 años	H	Sika
6398	2 años	H	Gamo
6444	2 años	H	Gamo
6441	2 años	H	Gamo
6387	2 años	H	Gamo
6451	2 años	H	Gamo
8115	2 años	H	Gamo

9019	2 años	H	Gamo
6760882	2 años	H	Gamo
749	2 años	H	Gamo
88891169	2 años	H	Gamo
6812382	2 años	H	Gamo
58076	2 años	H	Gamo
161314085	2 años	H	Gamo
59757	2 años	H	Gamo
4891	2 años	H	Gamo
57900	2 años	H	Gamo
7910	2 años	H	Gamo
216205835	2 años	H	Gamo
8040552	2 años	H	Gamo
1321	2 años	H	Sika
SID	2 años	H	Gamo
860013	2 años	H	Gamo
6785	2 años	H	Gamo
410	2 años	H	Gamo
6456	2 años	H	Gamo
58343	2 años	H	Gamo
90025000088	2 años	H	Muflón
21307	2 años	H	Sika
518	2 años	H	Gamo
4891	2 años	H	Gamo
58121	2 años	H	Sika
304	2 años	H	Sika
58210	2 años	H	Gamo
420	2 años	H	Gamo
87840274	2 años	H	Gamo
6389	2 años	H	Gamo

6437	2 años	H	Gamo
658343	2 años	H	Gamo
215073365	2 años	H	Gamo
216205836	2 años	H	Gamo
925000688210	2 años	H	Gamo
6482	2 años	H	Gamo
7840274	2 años	H	Gamo
3045	2 años	H	Gamo
608181321	2 años	H	A. Sable
81356	2 años	H	Gamo
8782	2 años	H	Gamo
7960	2 años	H	Gamo
68123832	2 años	H	Gamo
215620583	2 años	H	Gamo
1631408565	2 años	H	Gamo
2181353	2 años	H	Gamo
2181364	2 años	H	Gamo
2181355	2 años	H	Gamo
1357	2 años	H	Gamo
328	2 años	H	Sika
6420	2 años	H	Gamo
21307336	2 años	H	Sika
57911	2 años	H	Gamo
437	2 años	H	Gamo
7916	2 años	H	Gamo
8822	2 años	H	Gamo
17112115	2 años	H	Cimarrón
SID	2 años	H	Ñu
6473	2 años	H	Sika

9000002114	2 años	H	Eland
Gemsdolk	2 años	H	Gemsdolk
3782	2 años	H	Gamo
121307	2 años	H	Gamo

Zoológico de Zacango, Estado de México

Identificación	Edad	Sexo	Especie
SID	3 años	M	Venado cola Blanca
4	3 años	M	Venado cola Blanca
Neza	3 años	H	Gamo
5	3 años	H	Muflón
1	3 años	H	Muflón
3	3 años	M	Venado cola blanca
2	3 años	H	Muflón
105	3 años	---	Pecari
SID	3 años	M	Muflón
2	3 años	M	Venado cola blanca

Tequisquiapan, Querétaro

Identificación	Edad	Sexo	Especie
C101	2 años	H	Venado cola blanca
Z13	2 años	H	Venado cola blanca
C107	2 años	H	Venado cola blanca
D118	2 años	H	Venado cola blanca
47	2 años	H	Venado cola blanca
Z7	2 años	H	Venado cola blanca

160	2 años	H	Venado cola blanca
A46	2 años	H	Venado cola blanca
172	2 años	H	Venado cola blanca
B76	2 años	H	Venado cola blanca
189	2 años	H	Venado cola blanca
200	2 años	H	Venado cola blanca
X35	2 años	H	Venado cola blanca
X8	2 años	H	Venado cola blanca
A67	2 años	H	Venado cola blanca
236	2 años	H	Venado cola blanca
A65	2 años	H	Venado cola blanca

Acayucan, Veracruz

Identificación	Edad	Sexo	Especie
0443	6 meses	H	Búfalo de agua
0519	6 meses	H	Búfalo de agua
0512	6 meses	H	Búfalo de agua
0444	6 meses	H	Búfalo de agua
0616	6 meses	H	Búfalo de agua
0452	6 meses	H	Búfalo de agua
0372	6 meses	H	Búfalo de agua
0449	6 meses	H	Búfalo de agua
0432	6 meses	H	Búfalo de agua
0436	6 meses	H	Búfalo de agua
0385	6 meses	H	Búfalo de agua
0501	6 meses	H	Búfalo de agua
0615	6 meses	H	Búfalo de agua
0635	6 meses	H	Búfalo de agua

0569	6 meses	H	Búfalo de agua
0375	6 meses	H	Búfalo de agua
0396	6 meses	H	Búfalo de agua
0387	6 meses	H	Búfalo de agua
0439	6 meses	H	Búfalo de agua
0368	6 meses	H	Búfalo de agua
0377	6 meses	H	Búfalo de agua
0414	6 meses	H	Búfalo de agua
0613	6 meses	H	Búfalo de agua
0586	6 meses	H	Búfalo de agua
0428	6 meses	H	Búfalo de agua
0390	6 meses	H	Búfalo de agua
0402	Bucarro	H	Búfalo de agua
0397		H	Búfalo de agua
0371	6 meses	H	Búfalo de agua
0612	6 meses	H	Búfalo de agua
0486	6 meses	H	Búfalo de agua
0565	6 meses	H	Búfalo de agua
0634	6 meses	H	Búfalo de agua
0438	6 meses	H	Búfalo de agua
0547	6 meses	H	Búfalo de agua
0414	6 meses	H	Búfalo de agua
0591	6 meses	H	Búfalo de agua
0503	6 meses	H	Búfalo de agua
0417	6 meses	H	Búfalo de agua
0599	6 meses	H	Búfalo de agua
0450	6 meses	H	Búfalo de agua
0527	6 meses	H	Búfalo de agua
0392	6 meses	H	Búfalo de agua
0533	6 meses	H	Búfalo de agua

0420	6 meses	H	Búfalo de agua
0446	6 meses	H	Búfalo de agua
0386	6 meses	H	Búfalo de agua
0581	6 meses	H	Búfalo de agua
0453	6 meses	H	Búfalo de agua
0406	6 meses	H	Búfalo de agua
0427	6 meses	H	Búfalo de agua
0575	6 meses	H	Búfalo de agua
0601	6 meses	H	Búfalo de agua
0376	6 meses	H	Búfalo de agua
0564	Bucarro	H	Búfalo de agua
0403		H	Búfalo de agua
0606	6 meses	H	Búfalo de agua
0437	6 meses	H	Búfalo de agua
0426	6 meses	H	Búfalo de agua
0383	6 meses	H	Búfalo de agua
0384	6 meses	H	Búfalo de agua
0381	6 meses	H	Búfalo de agua
0410	6 meses	H	Búfalo de agua
0552	6 meses	H	Búfalo de agua
0412	6 meses	H	Búfalo de agua
0442	6 meses	H	Búfalo de agua
0517	6 meses	H	Búfalo de agua
0543	6 meses	H	Búfalo de agua
0421	6 meses	H	Búfalo de agua
0411	6 meses	H	Búfalo de agua
0455	6 meses	H	Búfalo de agua
0580	6 meses	H	Búfalo de agua
0380	6 meses	H	Búfalo de agua
0407	6 meses	H	Búfalo de agua

0431	6 meses	H	Búfalo de agua
0389	6 meses	H	Búfalo de agua
0429	6 meses	H	Búfalo de agua
0379	6 meses	H	Búfalo de agua
0567	6 meses	H	Búfalo de agua
0399	6 meses	H	Búfalo de agua
0594	6 meses	H	Búfalo de agua
0447	6 meses	H	Búfalo de agua
0445	Bucorro	H	Búfalo de agua
0477		H	Búfalo de agua
0448	6 meses	H	Búfalo de agua
0441	6 meses	H	Búfalo de agua
0394	6 meses	H	Búfalo de agua
0605	6 meses	H	Búfalo de agua
0451	6 meses	H	Búfalo de agua
0454	6 meses	H	Búfalo de agua
0577	6 meses	H	Búfalo de agua
0373	6 meses	H	Búfalo de agua
0561	6 meses	H	Búfalo de agua
0424	6 meses	H	Búfalo de agua
0404	6 meses	H	Búfalo de agua
0415	6 meses	H	Búfalo de agua
0434	6 meses	H	Búfalo de agua
0559	6 meses	H	Búfalo de agua
0425	6 meses	H	Búfalo de agua
0228	6 meses	H	Búfalo de agua
0229	6 meses	H	Búfalo de agua
0245	6 meses	H	Búfalo de agua
0254	6 meses	H	Búfalo de agua
0250	6 meses	H	Búfalo de agua

0267	6 meses	H	Búfalo de agua
0251	6 meses	H	Búfalo de agua
0233	6 meses	H	Búfalo de agua
0236	6 meses	H	Búfalo de agua
0286	6 meses	H	Búfalo de agua
0288	6 meses	H	Búfalo de agua
0278	Bucerro	H	Búfalo de agua
0278	6 meses	H	Búfalo de agua
0217	6 meses	H	Búfalo de agua
0216	6 meses	H	Búfalo de agua
0284	6 meses	H	Búfalo de agua
0277	6 meses	H	Búfalo de agua
0274	6 meses	H	Búfalo de agua
0232	6 meses	H	Búfalo de agua
0247	6 meses	H	Búfalo de agua
0227	6 meses	H	Búfalo de agua
0265	6 meses	H	Búfalo de agua
455992	6 meses	H	Búfalo de agua
0269	6 meses	H	Búfalo de agua
508	6 meses	H	Búfalo de agua
80	6 meses	H	Búfalo de agua
47	6 meses	H	Búfalo de agua
517	6 meses	H	Búfalo de agua
0290	6 meses	H	Búfalo de agua
506	6 meses	H	Búfalo de agua
105	6 meses	H	Búfalo de agua
*8	6 meses	H	Búfalo de agua
0215	6 meses	H	Búfalo de agua
0253	6 meses	H	Búfalo de agua
29	6 meses	H	Búfalo de agua

*1	6 meses	H	Búfalo de agua
40	6 meses	H	Búfalo de agua
455903	6 meses	H	Búfalo de agua
20	Bucorro	H	Búfalo de agua

Identificación	Edad	Sexo	Especie
99	6 meses	H	Búfalo de agua
451	6 meses	H	Búfalo de agua
0226	6 meses	H	Búfalo de agua
95	6 meses	H	Búfalo de agua
66	6 meses	H	Búfalo de agua
503	6 meses	H	Búfalo de agua
00	6 meses	H	Búfalo de agua
62	6 meses	H	Búfalo de agua
93	6 meses	H	Búfalo de agua
57	6 meses	H	Búfalo de agua
35	6 meses	H	Búfalo de agua
8	6 meses	H	Búfalo de agua
153	6 meses	H	Búfalo de agua
0238	6 meses	H	Búfalo de agua
455352	6 meses	H	Búfalo de agua
0213	6 meses	H	Búfalo de agua
0272	6 meses	H	Búfalo de agua
0230	6 meses	H	Búfalo de agua
0276	6 meses	H	Búfalo de agua
86	6 meses	H	Búfalo de agua
*3	6 meses	H	Búfalo de agua
17	6 meses	H	Búfalo de agua
507	6 meses	H	Búfalo de agua

51	6 meses	H	Búfalo de agua
0270	6 meses	H	Búfalo de agua
0264	6 meses	H	Búfalo de agua
0240	Bucarro	H	Búfalo de agua
0263		H	Búfalo de agua
0268	6 meses	H	Búfalo de agua
0285	6 meses	H	Búfalo de agua
55	6 meses	H	Búfalo de agua
26	6 meses	H	Búfalo de agua
09	6 meses	H	Búfalo de agua
2120	6 meses	H	Búfalo de agua
500	6 meses	H	Búfalo de agua
0275	6 meses	H	Búfalo de agua
510	6 meses	H	Búfalo de agua
98	6 meses	H	Búfalo de agua
19	6 meses	H	Búfalo de agua
505	6 meses	H	Búfalo de agua
29	6 meses	H	Búfalo de agua
0273	6 meses	H	Búfalo de agua
*5	6 meses	H	Búfalo de agua
0214	6 meses	H	Búfalo de agua
65	6 meses	H	Búfalo de agua
420 Bucarro	6 meses	H	Búfalo de agua
509	6 meses	H	Búfalo de agua
153	6 meses	H	Búfalo de agua
*6	6 meses	H	Búfalo de agua
001	6 meses	H	Búfalo de agua
0224	6 meses	H	Búfalo de agua
512	6 meses	H	Búfalo de agua
108	6 meses	H	Búfalo de agua

456035	6 meses	H	Búfalo de agua
375 Bucerro	Bucerro	H	Búfalo de agua
384 Bucerro		H	Búfalo de agua
425 Bucerro	6 meses	H	Búfalo de agua
63	6 meses	H	Búfalo de agua
94	6 meses	H	Búfalo de agua
*4	6 meses	H	Búfalo de agua
09	6 meses	H	Búfalo de agua
*7	6 meses	H	Búfalo de agua
59	6 meses	H	Búfalo de agua
0232	6 meses	H	Búfalo de agua
03	6 meses	H	Búfalo de agua
0241	6 meses	H	Búfalo de agua
73	6 meses	H	Búfalo de agua
CG	6 meses	H	Búfalo de agua
Semental	6 meses	H	Búfalo de agua
507	6 meses	H	Búfalo de agua
0259	6 meses	H	Búfalo de agua
0266	6 meses	H	Búfalo de agua
508	6 meses	H	Búfalo de agua
0219	6 meses	H	Búfalo de agua
501	6 meses	H	Búfalo de agua
50	6 meses	H	Búfalo de agua
515	6 meses	H	Búfalo de agua
0221	6 meses	H	Búfalo de agua
0225	6 meses	H	Búfalo de agua
*9	6 meses	H	Búfalo de agua
384 Bucerro Tocho	6 meses	H	Búfalo de agua
0261	6 meses	H	Búfalo de agua

0277	Bucarro	H	Búfalo de agua
------	---------	---	----------------

Anexo II

RELACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS Y NEGATIVAS

Mil Aguas, Veracruz

Identificación	VIL	HCV	Mahony
7	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)
15	(+)	(-)	(+)
12	(-)	(-)	(-)
21	(-)	(-)	(-)
18	(-)	(-)	(-)
21	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)
11	(-)	(-)	(-)
6	(+)	(-)	(+)
2	(-)	(-)	(-)
13	(-)	(-)	(-)
16	(-)	(-)	(-)
14	(-)	(-)	(-)
20	(-)	(-)	(-)
17	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)
19	(-)	(-)	(-)

5	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)
10	(-)	(-)	(-)
22	(-)	(-)	(-)
18	(-)	(-)	(-)
17	(-)	(-)	(-)
8	(-)	(-)	(-)
1	(-)	(-)	(-)

Achotal, Veracruz

Identificación	VIL	HCV	Mahony
1529	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)
1	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)
13	(-)	(-)	(-)
11	(-)	(-)	(-)
17	(-)	(-)	(-)
144	(-)	(-)	(-)
10	(-)	(-)	(-)
19	(-)	(-)	(-)
297	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)
18	(-)	(-)	(-)
152	(-)	(-)	(-)
12	(-)	(-)	(-)

7	(-)	(-)	(-)
176	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)
13	(-)	(-)	(-)
14	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)
20	(-)	(-)	(-)
16	(-)	(-)	(-)
2178	(-)	(-)	(-)
8	(-)	(-)	(-)

Zoológico de Chapultepec, Ciudad de México

Identificación	VIL	HCV	Mahony
8174	(-)	(-)	(-)
557338784	(-)	(-)	(-)
7451	(-)	(-)	(-)
900252	(-)	(-)	(-)
1353	(-)	(-)	(-)
1355	(-)	(-)	(-)
7924	(-)	(-)	(-)
6407	(-)	(-)	(-)
536	(-)	(-)	(-)
330308	(-)	(-)	(-)
846	(-)	(-)	(-)
6398	(-)	(-)	(-)
6444	(-)	(-)	(-)
6441	(-)	(-)	(-)
6387	(-)	(-)	(-)

6451	(-)	(-)	(-)
8115	(-)	(-)	(-)
9019	(-)	(-)	(-)
6760882	(-)	(-)	(-)
749	(-)	(-)	(-)
88891169	(-)	(-)	(-)
6812382	(-)	(-)	(-)
58076	(-)	(-)	(-)
161314085	(-)	(-)	(-)
59757	(-)	(-)	(-)
4891	(-)	(-)	(-)
57900	(-)	(-)	(-)
7910	(-)	(-)	(-)
216205835	(-)	(-)	(-)
8040552	(-)	(-)	(-)
1321	(-)	(-)	(-)
SID	(-)	(-)	(-)
860013	(-)	(-)	(-)
6785	(-)	(-)	(-)
410	(-)	(-)	(-)
6456	(-)	(-)	(-)
58343	(-)	(-)	(-)
90025000088	(-)	(-)	(-)
21307	(-)	(-)	(-)
518	(-)	(-)	(-)
4891	(-)	(-)	(-)
58121	(-)	(-)	(-)
304	(-)	(-)	(-)
58210	(-)	(-)	(-)
420	(-)	(-)	(-)

87840274	(-)	(-)	(-)
6389	(-)	(-)	(-)
6437	(-)	(-)	(-)
658343	(-)	(-)	(-)
215073365	(-)	(-)	(-)
216205836	(-)	(-)	(-)
925000688210	(-)	(-)	(-)
6482	(-)	(-)	(-)
7840274	(-)	(-)	(-)
3045	(-)	(-)	(-)
608181321	(-)	(-)	(-)
81356	(-)	(-)	(-)
8782	(-)	(-)	(-)
7960	(-)	(-)	(-)
68123832	(-)	(-)	(-)
215620583	(-)	(-)	(-)
1631408565	(-)	(-)	(-)
2181353	(-)	(-)	(-)
2181364	(-)	(-)	(-)
2181355	(-)	(-)	(-)
1357	(-)	(-)	(-)
328	(-)	(-)	(-)
6420	(-)	(-)	(-)
21307336	(-)	(-)	(-)
57911	(-)	(-)	(-)
437	(-)	(-)	(-)
7916	(-)	(-)	(+)
8822	(-)	(-)	(-)
17112115	(-)	(-)	(-)
SID	(-)	(-)	(-)

6473	(-)	(-)	(-)
9000002114	(-)	(-)	(-)
Gemsdolk	(-)	(-)	(-)
3782	(+)	(-)	(-)
121307	(-)	(-)	(-)

Zoológico de Zacango, Estado de México

Identificación	VIL	HCV	Mahony
SID	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)
Neza	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)
1	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)
105	(-)	(-)	(-)
SID	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)

Tequisquiapan, Querétaro

Identificación	VIL	HCV	Mahony
C101	(-)	(-)	(-)
Z13	(-)	(-)	(-)
C107	(-)	(-)	(-)
D118	(-)	(-)	(-)
47	(-)	(-)	(-)

Z7	(-)	(-)	(-)
160	(-)	(-)	(-)
A46	(-)	(-)	(-)
172	(-)	(-)	(-)
B76	(-)	(-)	(-)
189	(-)	(-)	(-)
200	(-)	(-)	(-)
X35	(-)	(-)	(-)
X8	(-)	(-)	(-)
A67	(-)	(-)	(-)
236	(-)	(-)	(-)
A65	(-)	(-)	(-)

Acayucan, Veracruz

Identificación	VIL	HCV	Mahony
0443	(-)	(-)	(-)
0519	(-)	(-)	(-)
0512	(-)	(-)	(-)
0444	(-)	(-)	(-)
0616	(-)	(-)	(-)
0452	(-)	(-)	(-)
0372	(-)	(-)	(-)
0449	(-)	(-)	(-)
0432	(-)	(-)	(-)
0436	(-)	(-)	(-)
0385	(-)	(-)	(-)
0501	(-)	(-)	(-)
0615	(-)	(-)	(-)

0635	(-)	(-)	(-)
0569	(-)	(-)	(-)
0375	(-)	(-)	(-)
0396	(-)	(-)	(-)
0387	(-)	(-)	(-)
0439	(-)	(-)	(-)
0368	(-)	(-)	(-)
0377	(-)	(-)	(-)
0414	(-)	(-)	(-)
0613	(-)	(-)	(-)
0586	(-)	(-)	(-)
0428	(-)	(-)	(-)
0390	(-)	(-)	(-)
0402	(-)	(-)	(-)
0397	(-)	(-)	(-)
0371	(-)	(-)	(-)
0612	(-)	(-)	(-)
0486	(-)	(-)	(-)
0565	(-)	(-)	(-)
0634	(-)	(-)	(-)
0438	(-)	(-)	(-)
0547	(-)	(-)	(-)
0414	(-)	(-)	(-)
0591	(-)	(-)	(-)
0503	(-)	(-)	(-)
0417	(-)	(-)	(-)
0599	(-)	(-)	(-)
0450	(-)	(-)	(-)
0527	(-)	(-)	(-)
0392	(-)	(-)	(-)

0533	(-)	(-)	(-)
0420	(-)	(-)	(-)
0446	(-)	(-)	(-)
0386	(-)	(-)	(-)
0581	(-)	(-)	(-)
0453	(-)	(-)	(-)
0406	(-)	(-)	(-)
0427	(-)	(-)	(-)
0575	(-)	(-)	(-)
0601	(-)	(-)	(-)
0376	(-)	(-)	(-)
0564	(-)	(-)	(-)
0403	(-)	(-)	(-)
0606	(-)	(-)	(-)
0437	(-)	(-)	(-)
0426	(-)	(-)	(-)
0383	(-)	(-)	(-)
0384	(-)	(-)	(-)
0381	(-)	(-)	(-)
0410	(-)	(-)	(-)
0552	(-)	(-)	(-)
0412	(-)	(-)	(-)
0442	(-)	(-)	(-)
0517	(-)	(-)	(-)
0543	(-)	(-)	(-)
0421	(-)	(-)	(-)
0411	(-)	(-)	(-)
0455	(-)	(-)	(-)
0580	(-)	(-)	(-)
0380	(-)	(-)	(-)

0407	(-)	(-)	(-)
0431	(-)	(-)	(-)
0389	(-)	(-)	(-)
0429	(-)	(-)	(-)
0379	(-)	(-)	(-)
0567	(-)	(-)	(-)
0399	(-)	(-)	(-)
0594	(-)	(-)	(-)
0447	(-)	(-)	(-)
0445	(-)	(-)	(-)
0477	(-)	(-)	(-)
0448	(-)	(-)	(-)
0441	(-)	(-)	(-)
0394	(-)	(-)	(-)
0605	(-)	(-)	(-)
0451	(-)	(-)	(-)
0454	(-)	(-)	(-)
0577	(-)	(-)	(-)
0373	(-)	(-)	(-)
0561	(-)	(-)	(-)
0424	(-)	(-)	(-)
0404	(-)	(-)	(-)
0415	(-)	(-)	(-)
0434	(-)	(-)	(-)
0559	(-)	(-)	(-)
0425	(-)	(-)	(-)
0228	(-)	(-)	(-)
0229	(-)	(-)	(-)
0245	(-)	(-)	(-)
0254	(-)	(-)	(-)

0250	(-)	(-)	(-)
0267	(-)	(-)	(-)
0251	(-)	(-)	(-)
0233	(-)	(-)	(-)
0236	(-)	(-)	(-)
0286	(-)	(-)	(-)
0288	(-)	(-)	(-)
0278	(-)	(-)	(-)
0278	(-)	(-)	(-)
0217	(-)	(-)	(-)
0216	(-)	(-)	(-)
0284	(-)	(-)	(-)
0277	(-)	(-)	(-)
0274	(-)	(-)	(-)
0232	(-)	(-)	(-)
0247	(-)	(-)	(-)
0227	(-)	(-)	(-)
0265	(-)	(-)	(-)
455992	(-)	(-)	(-)
0269	(-)	(-)	(-)
508	(-)	(-)	(-)
80	(-)	(-)	(-)
47	(-)	(-)	(-)
517	(-)	(-)	(-)
0290	(-)	(-)	(-)
506	(-)	(-)	(-)
105	(-)	(-)	(-)
*8	(-)	(-)	(-)
0215	(-)	(-)	(-)
0253	(-)	(-)	(-)

29	(-)	(-)	(-)
*1	(-)	(-)	(-)
40	(-)	(-)	(-)
455903	(-)	(-)	(-)
20	(-)	(-)	(-)

99	(-)	(-)	(-)
451	(-)	(-)	(-)
0226	(-)	(-)	(-)
95	(-)	(-)	(-)
66	(-)	(-)	(-)
503	(-)	(-)	(-)
00	(-)	(-)	(-)
62	(-)	(-)	(-)
93	(-)	(-)	(-)
57	(-)	(-)	(-)
35	(-)	(-)	(-)
8	(-)	(-)	(-)
153	(-)	(-)	(-)
0238	(-)	(-)	(-)
455352	(-)	(-)	(-)
0213	(-)	(-)	(-)
0272	(-)	(-)	(-)
0230	(-)	(-)	(-)
0276	(-)	(-)	(-)
86	(-)	(-)	(-)
*3	(-)	(-)	(-)
17	(-)	(-)	(-)
507	(-)	(-)	(-)

51	(-)	(-)	(-)
0270	(-)	(-)	(-)
0264	(-)	(-)	(-)
0240	(-)	(-)	(-)
0263	(-)	(-)	(-)
0268	(-)	(-)	(-)
0285	(-)	(-)	(-)
55	(-)	(-)	(-)
26	(-)	(-)	(-)
09	(-)	(-)	(-)
2120	(-)	(-)	(-)
500	(-)	(-)	(-)
0275	(-)	(-)	(-)
510	(-)	(-)	(-)
98	(-)	(-)	(-)
19	(-)	(-)	(-)
505	(-)	(-)	(-)
29	(-)	(-)	(-)
0273	(-)	(-)	(-)
*5	(-)	(-)	(-)
0214	(-)	(-)	(-)
65	(-)	(-)	(-)
420 Bucerro	(-)	(-)	(-)
509	(-)	(-)	(-)
153	(-)	(-)	(-)
*6	(-)	(-)	(-)
001	(-)	(-)	(-)
0224	(-)	(-)	(-)
512	(-)	(-)	(-)
108	(-)	(-)	(-)

456035	(-)	(-)	(-)
375 Bucerro	(-)	(-)	(-)
384 Bucerro	(-)	(-)	(-)
425 Bucerro	(-)	(-)	(-)
63	(-)	(-)	(-)
94	(-)	(-)	(-)
*4	(-)	(-)	(-)
09	(-)	(-)	(-)
*7	(-)	(-)	(-)
59	(-)	(-)	(-)
0232	(-)	(-)	(-)
03	(-)	(-)	(-)
0241	(-)	(-)	(-)
73	(-)	(-)	(-)
CG	(-)	(-)	(-)
Semental	(-)	(-)	(-)
507	(-)	(-)	(-)
0259	(-)	(-)	(-)
0266	(-)	(-)	(-)
508	(-)	(-)	(-)
0219	(-)	(-)	(-)
501	(-)	(-)	(-)
50	(-)	(-)	(-)
515	(-)	(-)	(-)
0221	(-)	(-)	(-)
0225	(-)	(-)	(-)
*9	(-)	(-)	(-)
384 Bucerro Tocho	(-)	(-)	(-)
0261	(-)	(-)	(-)

0277	(-)	(-)	(-)
------	-----	-----	-----

Anexo III

SECUENCIAS DETECTADAS DE PESTIVIRUS

>Seq1 [*Pestivirus A*] 5' UTR (fragment) of *Pestivirus A* isolation from fallow deer

[*Dama Dama*] ID: 7916

ATAAAAAACATACAGTGAGGCCTCTGCCAACCCCTATCAGGCTGTATTCGTAAC
ACTCGGTAAAACTGCTTTTACCTGGGCGACCCCGCTCACGTTAAGATGTGCG
TTGCCGCATGCCCTCGTCCACGTGGCATCTCGAGACCTTTATTCCAAGGCGTCG
AACCACTGACGACTACCCTGTACTCAGGGCTTAAGCCATCCAACGAACTCACC
ACTGTTGCTACCCCCCTCATTATGCTAGTCCTACTATGGGCATATGAGGGGGGT
CGCAAGGGGGGTGAGTTCGTTGGATGGCTTAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCG
TCAGTGGTTCGACGCCTTGAAATAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGG
CATGCCCAAAGCACATCTTAACCTGAGCGGGGGTCCAGGTAAAAGCAGTT
TTAACCGACTGTTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCACTGTA
TTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGAAAAC

>Seq2 [*Pestivirus A*] 5' UTR (fragment) of *Pestivirus A* isolation from water buffalo

[*Bubalus bubalis*] ID: 6

ATGCCCATAGTAGGACTAGCATAATGAGGGGGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCG
TTGGATGGCTTAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCCTTGG
AATAAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCCAAAGCACATCTTA
ACCTGAGCGGGGGTCCAGGTAAAAGCAGTTTTAACCGACTGTTACGAATA
CAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCACTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCT
GTACATGGCACATGGAGTTGA

>Seq3 [*Pestivirus A*] 5' UTR (fragment) of *Pestivirus A* isolation from water buffalo

[*Bubalus bubalis*] ID: 15

ATGCCCATAGTAGGACTAGCATAATGAGGGGGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCG
TTGGATGGCTTAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCCTTGG

AATAAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCCAAAGCACATCTTA
ACCTGAGCGGGGGTCCGCCAGGTAAAAGCAGTTTTAACCGACTGTTACGAATA
CAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCACTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCT
GTACATGGCACATGGAGTTGAA

REFERENCIAS

1. Gómez-Romero, N. *et al.* Detection of border disease virus in Mexican cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* **65**, 267–271 (2018).
2. ICTV. *ICTV Online (10th) Report. Flaviviridae, Genus: Pestivirus.* (2017).
3. International Committee on Taxonomy of Viruses. & King, A. *Virus taxonomy : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* (Elsevier, 2012).
4. Gottipati, K., Acholi, S., Ruggli, N. & Choi, K. H. Autocatalytic activity and substrate specificity of the pestivirus N-terminal protease Npro. *Virology* **452–453**, 303–309 (2014).
5. Rüménapf, T., Stark, R., Heimann, M. & Thiel, H. J. N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J. Virol.* **72**, 2544–7 (1998).
6. Stark, R., Meyers, G., Rüménapf, T. & Thiel, H. J. Processing of Pestivirus Polyprotein: Cleavage Site between Autoprotease and Nucleocapsid Protein of Classical Swine Fever Virus. *J. Virol.* **67**, 7088–7095 (1993).
7. Krey, T. *et al.* Crystal structure of the pestivirus envelope glycoprotein Erns and mechanistic analysis of its ribonuclease activity. *Structure* **20**, 862–873 (2012).
8. Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E. & Thiel, H. J. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* **261**, 1169–71 (1993).
9. Ruggli, N. *et al.* Npro of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN- α/β induction. *Virology* **340**, 265–276 (2005).
10. Hilton, L. *et al.* The NPro Product of Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits DNA Binding by Interferon Regulatory Factor 3 and Targets It for Proteasomal

- Degradation. *J. Virol.* **80**, 11723–11732 (2006).
11. Meyers, G. *et al.* Bovine Viral Diarrhea Virus: Prevention of Persistent Fetal Infection by a Combination of Two Mutations Affecting Erns RNase and Npro Protease. *J. Virol.* **81**, 3327–3338 (2007).
 12. Schweizer, M. & Peterhans, E. Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits Double-Stranded RNA-Induced Apoptosis and Interferon Synthesis Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits Double-Stranded RNA-Induced Apoptosis and Interferon Synthesis. *J. Virol.* **75**, 4692–4698 (2001).
 13. Ruggli, N. *et al.* Classical Swine Fever Virus Can Remain Virulent after Specific Elimination of the Interferon Regulatory Factor 3-Degrading Function of Npro. *J. Virol.* **83**, 817–829 (2009).
 14. Python, S., Gerber, M., Suter, R., Ruggli, N. & Summerfield, A. Efficient Sensing of Infected Cells in Absence of Virus Particles by Blasmacytoid Dendritic Cells Is Blocked by the Viral Ribonuclease Erns. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
 15. Zurcher, C., Sauter, K.-S., Mathys, V., Wyss, F. & Schweizer, M. Prolonged Activity of the Pestiviral RNase Erns as an Interferon Antagonist after Uptake by Clathrin-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* **88**, 7235–7243 (2014).
 16. Rocca, S. La, Herbert, R. & Crooke, H. Loss of Interferon Regulatory Factor 3 in Cells Infected with Classical Swine Fever Virus Involves the N-Terminal Protease, N pro. *J. Virol.* **79**, 7239–7247 (2005).
 17. Tautz, N., Tews, B. A. & Meyers, G. *The Molecular Biology of Pestiviruses. Advances in Virus Research* **93**, (Elsevier Inc., 2015).
 18. Pankraz, A., Preis, S., Thiel, H. J., Gallei, A. & Becher, P. A single point mutation in nonstructural protein NS2 of bovine viral diarrhea virus results in temperature-sensitive attenuation of viral cytopathogenicity. *J. Virol.* **83**, 12415–12423 (2009).
 19. Hinnebusch, A. G. & Lorsch, J. R. The mechanism of eukaryotic translation initiation: New insights and challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a011544–a011544 (2012).
 20. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **40**, D343–D350 (2012).
 21. Harada, T., Tautz, N. & Thiel, H. J. E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus

- polyprotein: processing and functional studies. *J. Virol.* **74**, 9498–9506 (2000).
22. Agapov, E. V. *et al.* leaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrheavirus. *J. Virol.* **78**, 2414–2425 (2004).
 23. Griffin, S. D. *et al.* The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* **535**, 34–38 (2003).
 24. Elbers, K. *et al.* Processing in the Pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2-p7. *J. Virol.* **70**, 4131–4135 (1996).
 25. Bolin, S. R. & Ridpath, J. F. Prevalence of bovine viral diarrhea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J Vet Diagn Invest* **10**, 135–9 (1998).
 26. Potgieter, L. N., McCracken, M. D., Hopkins, F. M. & Walker, R. D. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am J Vet Res* **45**, 687–90 (1984).
 27. Kummerer, B. M. & Meyers, G. Correlation between Point Mutations in NS2 and the Viability and Cytopathogenicity of Bovine Viral Diarrhea Virus Strain Oregon Analyzed with an Infectious cDNA Clone. *J. Virol.* **74**, 390–400 (2000).
 28. Langedijk, J. P. *et al.* A structural model of Pestivirus E(rns) based on disulfide bond connectivity and homology modeling reveals an extremely rare vicinal disulfide. *J. Virol.* **76**, 10383–10392 (2002).
 29. Xu, J. *et al.* Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for Pestivirus replication. *J. Virol.* **71**, 5312–5322 (1997).
 30. Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C. & Studdert, M. J. No Title. *Vet. Virol.* **third edit**, 555-568.629 págs
 31. Gu, B. *et al.* The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J. Virol.* **74**, 1794–1800 (2000).
 32. Becher, P., Thiel, H. J., Collins, M., Brownlie, J. & Orlich, M. Cellular Sequences in Pestivirus Genomes Encoding Gamma-Aminobutyric Acid (A) Receptor-Associated Protein an Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16 Kilodaltons. *J. Virol.* **76**, 13069–13076 (2002).

33. Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G. & Thiel, H. J. Serine protease of Pestiviruses: determination of cleavage sites. *J. Virol.* **71.7**, 5415–5422 (1997).
34. Qu, L., McMullan, L. K. & Rice, C. M. Isolation and characterization of noncytopathic Pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J. Virol.* **75**, 10651–10662 (2001).
35. Reed, K. E., Gorbalenya, A. E. & Rice, C. M. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family Flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.* **72**, 6199–6206 (1998).
36. Ansari, I. H. *et al.* Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5B locus in virion assembly. *J. Virol.* **78**, 9612–9623 (2004).
37. Tautz, N. *et al.* Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic Pestivirus replicons. *J. Virol.* **73**, 9422–432
38. Thiel, H. J., Plagemann, P. G. W. & Moennig, V. Pestiviruses. En: Fields. *Virology* **3rd editio**, 1059±1074
39. Murray, C. L., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. Bovine Viral Diarrhea Virus Core Is an Intrinsically Disordered Protein That Binds RNA. *J. Virol.* 1294–1304 (2008).
40. Lindenbach, B. D., Murray, C. L., Thiel, H. J. & Rice, C. M. Flaviviridae. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.). *Fields Virol.* **6**, 712–746 (2013).
41. Weiland, E. *et al.* Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide linked heterodimer. *J. Virol.* **64**, 3563–3569 (1990).
42. Ronecker, S., Zimmer, G., Herrler, G., Greiser-Wilke, I. & Grummer, B. Formation of bovine viral diarrhea virus E1–E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *J. Gen. Virol.* **89**, 2114–2121 (2008).
43. Donis, R. O., Corapi, W. & Dubovi, E. J. Neutralizing Monoclonal Antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus Bind to the 56K to 58K Glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **69**, 77–86 (1988).
44. Liang, D. *et al.* e envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant Pestivirus. *J. Gen. Virol.* **84**, 1269–1274 (2003).
45. Purchio, A. F., Larson, R. & Collet, M. S. A Characterization of Bovine Viral diarrhea virus proteins. *J. Virol.* 666–669 (1984).

46. Grummer, B., Beer, M., Liebler-Tenorio, E. & Greiser-Wilke, I. Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* **82**, 2597–2605 (2001).
47. Sagar, M. & Goyal, R. J. F. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control. (2008).
48. Becher, P. & Tautz, N. RNA recombination in pestiviruses: cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA Biol.* **8**, 216–24 (2011).
49. Gómez-Romero, N. E. Determinación de los genotipos del virus de la diarrea viral bovina predominantes en poblaciones ganderas de seis regiones de México.pdf. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2016).
50. Rondón, I. Diarrea vial bovina: patogénesis e inmunopatología. *Rev. MVZ Córdoba* **11**, 694–704 (2006).
51. Lértora, W. J. Revista veterinaria. *Rev. Vet.* **14**, 42–51 (2003).
52. Vilček, Š. & Nettleton, P. F. F. Pestiviruses in wild animals. *Vet. Microbiol.* **116**, 1–12 (2006).
53. Baradel, J. M. *et al.* Results of a serological survey of wild mammals in France. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* **7**, 873–883 (1988).
54. Lawman, M. J. P., Evans, D., Gibbs, E. P. J., McDiarmid, A. & Rowe, L. A Preliminary Survey of British Deer for Antibody to Some Virus Diseases of Farm Animals. *Br. Vet. J.* **134**, 85–91 (1978).
55. McMartin, D. A., Snodgrass, D. R. & Corrigan, W. Bovine virus diarrhoea antibody in a Scottish red deer. *Vet. Rec.* **100**, 187 (1977).
56. Karstad, L. Bovine virus diarrhoea. in *Infectious Diseases of Wild Mammals* (ed. Iowa State University Press) 576 (Iowa State University Press, 2000).
57. Giovannini, A., Cancellotti, F. M., Turilli, C., Randi, E. & Canceflotti, F. M. Serological investigations for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (*Cervus dama*) and wild boar (*Sus scrofa*) of the San Rossore Preserve, Tuscany, Italy. *Source J. Wildl. Dis. Wildl. Dis. Assoc. J. Wildl. Dis.* **24**, 127–132 (1988).
58. Couvillion, C. E., Jenney, E. W., Pearson, J. E. & Coker, M. E. Survey for antibodies to viruses of bovine virus diarrhea, bluetongue, and epizootic hemorrhagic disease in

- hunter-killed mule deer in New Mexico. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **177**, 790–1 (1980).
59. Elazhary, M. A., Roy, R. S. & Fréchette, J. L. Serological evidence of IBR and BVD infection in caribou (*Rangifer tarandus*). *Vet. Rec.* **105**, 336 (1979).
 60. Elazhary, M. A., Frechette, J. L., Silim, A. & Roy, R. S. Serological evidence of some bovine viruses in the caribou (*Rangifer tarandus caribou*) in Quebec. *J Wildl Dis* **17**, 609–612 (1981).
 61. Baker, J. A., York, C. J., Gillepsie, J. H. & Mitchell, G. B. Virus diarrhea in cattle. *Am. J. Vet. Res.* **15**, 525–531 (1954).
 62. Hamblin, C. & Hedger, R. S. The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in African wildlife. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2**, 295–303 (1979).
 63. Parks, J. B. & England, J. J. A serological survey for selected viral infections of Rocky Mountain bighorn sheep. *J Wildl Dis* **10**, 107–110 (1974).
 64. Turner, J. C. & Payson, J. B. Prevalence of antibodies of selected infectious disease agents in the peninsular desert bighorn sheep (*Ovis canadensis cremnobates*) of the Santa Rosa Mountains, California. *J. Wildl. Dis.* **18**, 243–5 (1982).
 65. Barrett, M. W. & Chalmers, G. A. A serologic survey of pronghorns in Alberta and Saskatchewan, 1970-1972. *J. Wildl. Dis.* **11**, 157–63 (1975).
 66. Doyle, L. G. & Heuschele, W. P. Bovine viral diarrhea virus infection in captive exotic ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **183**, 1257–9 (1983).
 67. Stauber, E. H., Autenrieth, R., Markham, O. D. & Whitbeck, V. A seroepidemiologic survey of three pronghorn (*Antilocapra americana*) populations in southeastern Idaho, 1975-1977. *J. Wildl. Dis.* **16**, 109–15 (1980).
 68. Blome, S., Beer, M. & Wernike, K. *New Leaves in the Growing Tree of Pestiviruses. Advances in Virus Research* **99**, (Elsevier Inc., 2017).
 69. Krametter-Froetscher, R. *et al.* Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *Vet. J.* **186**, 342–346 (2010).
 70. Laddomada, A. Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Vet. Microbiol.* (2000). doi:10.1016/S0378-1135(00)00139-5
 71. Moennig, V. Introduction to classical swine fever: Virus, disease and control policy. *Veterinary Microbiology* (2000). doi:10.1016/S0378-1135(00)00137-1

72. Zupancic, Z. *et al.* Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Heal.* (2002). doi:10.1046/j.1439-0450.2002.00562.x
73. Albina, E. *et al.* A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Vet. Microbiol.* (2000). doi:10.1016/S0378-1135(00)00255-8
74. Elbers, A. R., Dekkers, L. J. & van der Giessen, J. W. Sero-surveillance of wild boar in The Netherlands, 1996-1999. *Rev. Sci. Tech.* (2000).
75. Brusckke, C. J., Weerdmeester, K., Van Oirschot, J. T. & Van Rijn, P. A. Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet. Microbiol.* **64**, 23–32 (1998).
76. Brownlie, J. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* **9**, 43–59 (1990).
77. Peterhans, E. & Schweizer, M. BVDV: A Pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals* **41**, 39–51 (2013).
78. Howard, C. J., Clarke, M. C., Sopp, P. & Brownlie, J. Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* **32.3**, 303–314 (1992).
79. McClurkin, A. W. *et al.* Production of a cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Can J Comp Med* **48**, 156–61 (1984).
80. Donis, R. O. & Dubovi, E. J. Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus biotypes. *Am J Vet Res* **48**, 1549–54 (1987).
81. Schweizer, M. & Peterhans, E. Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. *J. Gen. Virol.* **80**, 1147–55 (1999).
82. Baigent, S. J. *et al.* Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent

- mechanism. *J. Virol.* **76**, 8979e88 (2002).
83. Baigent, S. J., Goodbourn, S. & McCauley, J. W. Differential activation of interferon regulatory factors-3 and -7 by non-cytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol* **100**, 135–44 (2004).
 84. Fiebach, A. R., Guzylack-Piriou, L., Python, S., Summerfield, A. & Ruggli, N. Classical swine fever virus Npro limits type I interferon induction in plasmacytoid dendritic cells by interacting with interferon regulatory factor 7. *J. Virol.* **85**, 8002–11 (2011).
 85. Welsh, M. D., Adair, B. M. & Foster, J. C. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **46**, 195–210 (1995).
 86. OIE. *Terrestrial manual.* (2015).
 87. Huang, Y. L., Deng, M. C., Wang, F. I., Huang, C. C. & Chang, C. Y. The challenges of classical swine fever control: Modified live and E2 subunit vaccines. *Virus Res.* **179**, 1–11 (2014).
 88. Leifer, I., Ruggli, N. & Blome, S. Approaches to define the viral genetic basis of classical swine fever virus virulence. *Virology* **438**, 51–55 (2013).
 89. Becher, P., Orlich, M. & Thiel, H. J. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: Generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J. Virol.* **75**, 6256–6264 (2001).
 90. Becher, P., Orlich, M. & Thiel, H. J. Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhoea virus result in altered growth characteristics. *J. Virol.* **74**, 7884–7894 (2000).
 91. Thomann, B. *et al.* Economic evaluation of the eradication program for bovine viral diarrhoea in the Swiss dairy sector. *Prev. Vet. Med.* **145**, 1–6 (2017).
 92. Solis-Calderon, J. J., Segura-Correa, V. M. & Segura-Correa, J. C. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. *Prev. Vet. Med.* **72**, 253–262 (2005).
 93. Dekker, A., Wensvoort, G. & Terpstra, C. Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross neutralization assays. *Vet. Microbiol.* **47**, 317–329 (1995).
 94. Harasawa, R., Giangaspero, M., Lbata, G. & Paton, D. J. Giraffe Strain of

- Pestivirus: Its Taxonomic Status Based on the 5'-Untranslated Region. *Microbiol. Immunol* **44**, 915–921 (2000).
95. Moennig, V. & Becher, P. Pestivirus control programs: how far have we come and where are we going? *Anim. Heal. Res. Rev.* **16**, 83–87 (2015).
 96. Vilcek, S., Ridpath, J. F., Van Campen, H., Cavender, J. L. & Warg, J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res.* **108**, 187–193 (2005).
 97. Thabti, F. *et al.* Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch. Virol.* **150**, 215–229
 98. Ciulli, S. *et al.* Evidence for Tunisian-Like Pestiviruses Presence in Small Ruminants in Italy Since 2007. *Transbound. Emerg. Dis.* **64**, 1243–1253 (2017).
 99. Schirrmeyer, H., Strebelow, G., Depner, K., Hoffmann, B. & Beer, M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* **85**, 3647–3652 (2004).
 100. H.P., Stalder, Meier P., Pfaffen G, *et al.* Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med* **72**, 37–41 (2005).