



---

# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VIRUS DE LA  
DIARREA VIRAL BOVINA COMO CONTAMINANTE EN SUERO  
FETAL BOVINO COMERCIALIZADO EN MÉXICO**

## **T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA Y ZOOTECNISTA  
PRESENTA:**

**SILVIA JAZMÍN RUBALCAVA HIDALGO**

Tutores:

Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara  
M en C. Ninnet Evelyn Gómez Romero



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS

A mi papá, Juan Rubalcava, quien fomentó en mí el amor por los animales y la investigación. Quien respondía mis dudas y me alentaba siempre a buscar más respuestas, a pensar diferente, a cuestionarlo todo. Quien siempre me motivó, creyó en mí y me enseñó lo valioso de la vida. Sus sabias palabras y su extraordinaria esencia las llevaré conmigo siempre. Hasta luego, pa.

A mi mamá, Mercedes Hidalgo, el mayor pilar de mi vida. Gracias por hacer todo lo humanamente posible para apoyar mi desarrollo personal y profesional. Por tu comprensión y amor incondicional. Gracias por inculcarme valores fundamentales con tu ejemplo y darme una vida digna, llena de amor y respeto. Eres mi mayor ejemplo de fortaleza, nobleza, lealtad y dedicación, además de brindar luz infinita a mi camino. Gracias por hacerme posible el llegar hasta aquí y mucho más.

Es gracias a ustedes quien soy hoy y el que cada día me esfuerce por ser mejor y superarme. Los admiro y los amo.

A mis hermanos, Carlos, Raúl, Mine, Ángel, Mario y Luan. Gracias por su apoyo, palabras, risas, aprendizajes y compañía. Siempre aprendo algo de cada uno y los llevo conmigo en la mente y en el corazón. Los amo, gracias por creer en mí.

A mi familia, a mi abuelita que tanto me apoyó y me llenó de amor y ternura, sin ella, mi camino no habría sido tan bendecido. A mis primas bellas que siempre son una hermosa compañía, las amo.

A Manu, por acompañarme en esta etapa tan importante, por tu apoyo, palabras y observaciones para mejorar mis procesos y para afrontar las situaciones adyacentes. Gracias por tu cariño, esfuerzo y muestras de afecto. Aunque tengamos perspectivas distintas, es enriquecedor compartirlas para construir la vida que queremos. Las mejores cosas de la vida, toman su tiempo. Te amo.

A mis amigas que siempre me alientan y me escuchan, son mi espacio seguro y feliz. Marianita, Lore, Cris, Libs, San, gracias por sacar lo mejor de mí, las amo. Tona, gracias por todo tu apoyo y compañía.

A mis compañeros de vida no humanos -¿Qué sería de mí sin ellos?- Por todas las noches de desvelo y días de estrés o de dispersión que me han acompañado, por darme los momentos de mayor paz y felicidad con su amor puro e incondicional que enriquece tanto mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

El financiamiento para este estudio fue otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica IN217919 “Identificación y caracterización genética de las cepas del virus de la diarrea viral bovina circulantes en poblaciones ganaderas de México” (FMVZ-UNAM).

A la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por la formación académica y por fomentar mi desarrollo profesional y personalmente.

A mis asesores:

Dr. Francisco Basurto, gracias por hacerme parte de su gran equipo de trabajo, por su tiempo y conocimientos compartidos, por los consejos profesionales y personales, pero sobre todo, por su apoyo, honestidad y confianza al guiarme durante el proceso de realización de este trabajo en mi estancia en el laboratorio de Vacunología y Constatación y en la etapa de vida compartida. Gracias por fomentar el nutrir mis conocimientos e intereses en la ciencia y en otros aspectos fundamentales de la vida.

Dra. Ninnet Gómez, gracias por la guía, paciencia, acompañamiento, confianza, consejos y apoyo en todo el camino de este proceso. Gracias por ser más que una notable asesora, pues en ti encontré a una gran persona quien siempre me tendió la mano.

Al honorable miembro del jurado por sus amables y certeras observaciones.

Presidente: Mtro. Miguel Ángel Quiroz Martínez Martínez

Vocal: Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales

Secretario: Dr. Alfredo Castañeda Ramírez

Suplente: Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara

Suplente: Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva

Al Dr. Verdugo y a su inquisitivo equipo de trabajo. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio de Microbiología Molecular, por sus contribuciones para mejorar este trabajo y por el apoyo brindado a lo largo de este proceso.

A la Dra. Mireya Juárez y a Don Miguel por el apoyo y espacio dedicados en el Laboratorio de Patología.

Al Dr. Humberto Ramírez por abrirme las puertas del laboratorio de Virología Molecular.

A mis compañeros y amigos de laboratorio; Vic, Ana Gaby, Joce, Adolfo, Ninna, Luis y Arlaé, por hacer del lugar de trabajo el más agradable, además de mi segundo hogar y por compartir tantas cosas a lo largo de este camino, hicieron de este proceso una gran y divertida experiencia. Gracias por todo su apoyo y palabras de aliento, los quiero mucho.

Al departamento de Microbiología e Inmunología y al área de preparación de medios y cultivos por brindarme las condiciones necesarias para mi desarrollo profesional y el de este trabajo.

A todas y todos quienes formaron parte del proceso de alguna u otra forma, gracias.

## CONTENIDO

|                                                                        |             |
|------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMEN</b>                                                         | <b>VIII</b> |
| <b>ABSTRACT</b>                                                        | <b>IX</b>   |
| <b>1 INTRODUCCIÓN</b>                                                  | <b>10</b>   |
| <b>1.1 ANTECEDENTES</b>                                                | <b>10</b>   |
| <b>1.2 CARACTERÍSTICAS DEL VDV B</b>                                   | <b>15</b>   |
| 1.2.1 Clasificación taxonómica                                         | 15          |
| 1.2.2 Morfología del virión                                            | 16          |
| 1.2.3 Genoma de los pestivirus                                         | 17          |
| 1.2.4 Proteínas virales                                                | 18          |
| 1.2.4.1 Proteínas estructurales                                        | 18          |
| 1.2.4.2 Proteínas no estructurales                                     | 18          |
| 1.2.5 Genotipos                                                        | 19          |
| 1.2.6 Biotipos                                                         | 21          |
| 1.2.7 Replicación                                                      | 22          |
| <b>1.3 EPIDEMIOLOGÍA</b>                                               | <b>24</b>   |
| 1.3.1 Prevalencia del VDV B                                            | 24          |
| 1.3.2 Situación en México                                              | 24          |
| 1.3.3 Impacto económico                                                | 26          |
| 1.3.4 Diagnóstico                                                      | 26          |
| 1.3.4.1 Detección del VDV B                                            | 26          |
| 1.3.4.2 Pruebas serológicas                                            | 28          |
| <b>1.4 PATOGENIA</b>                                                   | <b>28</b>   |
| 1.4.1 Transmisión                                                      | 30          |
| 1.4.2 Presentaciones clínicas                                          | 31          |
| 1.4.2.1 Bovinos no gestantes                                           | 32          |
| 1.4.2.1.1 Diarrea viral bovina subclínica                              | 32          |
| 1.4.2.1.2 Diarrea viral bovina aguda                                   | 32          |
| 1.4.2.1.3 Diarrea viral bovina severa                                  | 32          |
| 1.4.2.1.4 Síndrome hemorrágico                                         | 33          |
| 1.4.2.2 Bovinos gestantes                                              | 33          |
| 1.4.2.2.1 Persistentemente infectados                                  | 34          |
| 1.4.2.2.1.1 Enfermedad de las mucosas                                  | 35          |
| <b>1.5 CONTAMINACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO POR VDV B</b>               | <b>35</b>   |
| 1.5.1 Distribución del SFB contaminado                                 | 36          |
| 1.5.2 Impacto de la Contaminación de SFB en líneas celulares y vacunas | 37          |
| <b>2 JUSTIFICACIÓN</b>                                                 | <b>39</b>   |

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3 HIPÓTESIS</b>                                                                | <b>40</b> |
| <b>4 OBJETIVOS</b>                                                                | <b>41</b> |
| <b>4.1 OBJETIVO GENERAL</b>                                                       | <b>41</b> |
| <b>4.2 OBJETIVOS PARTICULARES</b>                                                 | <b>42</b> |
| <b>5 MATERIAL Y MÉTODOS</b>                                                       | <b>43</b> |
| <b>5.1 MUESTRAS</b>                                                               | <b>43</b> |
| <b>5.2 EXTRACCIÓN DE ARN</b>                                                      | <b>43</b> |
| <b>5.3 TRANSCRIPTASA REVERSA-REACCIÓN EN CADENA DE LA<br/>POLIMERASA (RT-PCR)</b> | <b>44</b> |
| <b>5.4 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO</b>                                  | <b>46</b> |
| <b>5.5 AISLAMIENTO DEL VDVB</b>                                                   | <b>46</b> |
| <b>5.6 INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)</b>                                               | <b>47</b> |
| 5.6.1 Muestras para la IHQ                                                        | 48        |
| <b>6 RESULTADOS</b>                                                               | <b>49</b> |
| <b>6.1 AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE LA REGIÓN 5'UTR</b>                       | <b>49</b> |
| <b>6.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO</b>                                                  | <b>50</b> |
| <b>6.3 AISLAMIENTO VIRAL</b>                                                      | <b>52</b> |
| 6.3.1 Inmunohistoquímica (IHQ)                                                    | 52        |
| 6.3.2 Muestras para la IHQ                                                        | 53        |
| <b>7 DISCUSIÓN</b>                                                                | <b>58</b> |
| <b>8 CONCLUSIONES</b>                                                             | <b>63</b> |
| <b>9 PROSPECTIVA</b>                                                              | <b>64</b> |
| <b>10 REFERENCIAS</b>                                                             | <b>65</b> |

## RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es uno de los principales patógenos con distribución mundial que afecta mayormente al ganado bovino y que puede generar grandes pérdidas económicas que ascienden hasta 46 millones de dólares por año. El VDVB causa la diarrea viral bovina (DVB), una enfermedad que se manifiesta con diversas presentaciones clínicas que van desde una forma subclínica hasta una fatal denominada enfermedad de las mucosas.

Debido a la capacidad del virus para atravesar la barrera placentaria, las infecciones durante la gestación dan lugar al nacimiento de animales persistentemente infectados (PI) con VDVB, los cuales tienen la capacidad de diseminar el virus durante toda su vida, por lo que desempeñan un papel importante en el mantenimiento del virus en el ganado. Debido a lo anterior, es posible encontrar al VDVB como contaminante de productos biológicos como el suero fetal bovino (SFB).

El SFB es utilizado como el principal suplemento y factor de crecimiento para cultivos celulares, los cuales se utilizan para la producción de vacunas y mantenimiento de virus semilla; por lo tanto, la infección intrauterina de bovinos con el VDVB a partir de los cuales se obtiene el SFB implica un riesgo importante en la producción de biológicos, así como en el diagnóstico e investigación en medicina humana y veterinaria. Como consecuencia de lo antes mencionado, también se han reportado brotes de DVB debido al uso de vacunas contaminadas.

El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de VDVB como contaminante en 16 muestras de SFB comercialmente disponibles en México y realizar la genotipificación de los VDVB identificados, para determinar los genotipos y subgenotipos presentes en dichas muestras, así como determinar su viabilidad mediante aislamiento viral.

Las 16 muestras fueron positivas para el VDVB por RT-PCR. Al realizar la caracterización de los virus detectados por medio de análisis filogenéticos, se determinó la contaminación de 13 muestras con el VDVB-1b, 2 con VDVB-1a y 1 con VDVB-2a. El patrón de resultados obtenidos es similar a los subgenotipos de VDVB que circulan en las poblaciones de ganado bovino de América del Norte y México. Así mismo, mediante la técnica de inmunoperoxidasa se demostró la actividad biológica del virus en 13 de 16 muestras evaluadas en cultivo celular.

## ABSTRACT

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is one of the leading cattle pathogens with worldwide distribution that produces significant economic losses estimated at up to 46 million dollars per year. BVDV causes bovine viral diarrhea (BVD), a disease associated with various clinical presentations, ranging from a subclinical to a fatal form named mucosal disease. BVD is characterized by pyrexia, leukopenia, thrombocytopenia, depression, anorexia, diarrhea, gastrointestinal erosions, hemorrhages, epistaxis, anemia, abortions, mummification, congenital malformations, and the birth of immunotolerant animals.

Due to the virus's ability to cross the placental barrier, infections during a particular stage of pregnancy result in the birth of persistently infected animals (PI) with BVDV. PI animals can be clinically healthy. However, they can spread the virus throughout their lives; thus, they play an essential role in maintaining the virus in cattle. In addition, these animals can be used to obtain fetal bovine serum (FBS).

FBS is the main supplement and growth factor for cell cultures used for vaccine production and master seeds maintenance. Therefore, BVDV intrauterine infection of calves implies a significant risk at the time of FBS collection and, hence, the production of the aforementioned biological products. Similarly, diagnosis and research in human and veterinary medicine can be affected by BVDV contamination. Consequently, DVB outbreaks have also been reported due to contaminated vaccines.

This study aimed to detect the presence of BVDV as a contaminant in 16 commercially available FBS in Mexico and to perform genetic characterization on the BVDV identified to determine the genotypes and subgenotypes present in samples, as well as to determine their viability by viral isolation.

All 16 samples were positive for BVDV by RT-PCR. Phylogenetic analysis revealed the contamination of 13 samples with BVDV-1b, two with BVDV-1a, and one with BVDV-2a. The BVDV pattern obtained is similar to those circulating in North America and Mexico cattle populations.

The information provided by this study highlights the need for efficient detection assays to ensure the safety, purity, and efficacy of biological products for human and veterinary use where FBS is used. It also suggests that constant monitoring of FBS, cell cultures, master seeds, and final products, such as vaccines, should be carried out. Likewise, using the immunoperoxidase technique, virus replication was found in 13 of 16 samples worked in cell culture.

# 1 INTRODUCCIÓN

El virus de diarrea viral bovina (VDVB), es uno de los principales patógenos de bovinos con distribución mundial (1), aunque se ha reportado que puede afectar a otros animales, tanto domésticos como silvestres, del orden Artiodactyla (2). Es causante de la enfermedad denominada diarrea viral bovina (DVB), la cual se ha asociado a varias manifestaciones clínicas que van desde una presentación inaparente hasta una fatal denominada enfermedad de las mucosas (EM) (3).

## 1.1 ANTECEDENTES

La DVB fue descrita por primera vez en Nueva York en 1946 como una enfermedad aguda, epizootica, caracterizada por gastroenteritis, lesiones erosivas en el tracto digestivo, leucopenia, pirexia, depresión, diarrea, anorexia y hemorragias (4); mientras que, en ese mismo año en Saskatchewan, Canadá, se reportó una enfermedad con signos similares a los de DVB pero más graves y con una mortalidad superior al 90% a la que llamaron “Enfermedad X” (5). Años más tarde se le nombró enfermedad de las mucosas (6) la cual, no podía ser reproducida experimentalmente. Investigaciones posteriores permitieron identificar que tanto la DVB como la EM son diferentes manifestaciones ocasionadas por un virus denominado VDVB (7,8). A finales de la década de 1950, en Alemania, diversos grupos describieron otra enfermedad con signos similares, a la que nombraron Schleimhautkrankheit (9). Posteriormente, la prueba de neutralización viral fue utilizada para demostrar que los agentes virales aislados, de los casos de la enfermedad de las mucosas en América del Norte, Reino Unido y Schleimhautkrankheit en Alemania eran el mismo (10,11).

En 1957, se aisló una cepa viral de un caso de DVB, el cual no producía efecto citopático *in vitro* (12). En el mismo año fue aislada una cepa citopática (CP) denominada Oregon C24V a partir de tejido de dos animales con EM (13). En ese momento, aún se desconocía la relación entre ambos agentes aislados; sin embargo, el descubrimiento de cepas citopáticas permitió el desarrollo de ensayos de seroneutralización y neutralización en placa que permitieron la caracterización de la relación antigénica entre los aislamientos virales de casos

de DVB como la cepa NY-1. Debido a los cambios desarrollados en cultivo celular las cepas CP fueron más fácilmente estudiadas que las no citopáticas (NCP). Los estudios que emplearon la neutralización de virus (10,11,14) determinaron que los agentes virales aislados de DVB y EM en América del Norte y Europa eran los mismos, y que la DVB y la EM eran en realidad diferentes manifestaciones de la enfermedad causadas por el mismo agente. Así, años más tarde, la enfermedad se conoció oficialmente como diarrea viral bovina-enfermedad de las mucosas (DVB-EM) (15). Posteriormente, en la década de los 60's se estableció que el VDVB estaba antigénicamente relacionado con el virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) (16). Más tarde, la evidencia serológica indicó que el agente que causa la enfermedad de la frontera (EF) en ovejas también estaba relacionado con el VDVB y el VFPC (17).

A pesar de que la DVB podía reproducirse experimentalmente, la EM no; los animales infectados experimentalmente con virus obtenidos de casos de dicha enfermedad, únicamente presentaban fiebre o signos leves de DVB (18). En estudios previos, se pensó que había un componente inmunológico en los casos de EM, puesto que los animales que enfermaron y murieron resultaban negativos a las pruebas serológicas aún obteniendo el aislamiento del virus a partir de muestras de sangre de dichos animales, lo que sugirió que eran incapaces de montar una respuesta inmunológica (14).

A finales de los años 60's, se sabía que los animales con EM tenían viremia persistente y que eran incapaces de producir anticuerpos neutralizantes contra el virus, incluso se observó que el suero fetal bovino (SFB) frecuentemente contenía al VDVB (19). Éste descubrimiento y el hecho de observar animales recién nacidos y de 1 año de edad infectados, sugirieron infecciones intrauterinas (20). Fue así como se desarrolló el concepto "tolerancia inmunológica al VDVB" en el ganado gestante infectado, proponiendo con esto, un mecanismo para explicar la infección persistente y la falla en la producción de anticuerpos contra el virus. Por lo tanto, la exposición al virus durante el proceso de reconocimiento de antígenos propios y no propios por el sistema inmune del feto, podría provocar que el feto reconozca al virus como propio, y con ello la ausencia de respuesta inmune contra el VDVB. Esto resultaría eventualmente

en el nacimiento de terneros infectados con el virus, e incapaces de montar una respuesta inmune contra el virus por la inducción de tolerancia inmunológica. Un mecanismo alternativo propuesto por Almquist WA en 1968 para la falta de anticuerpos neutralizantes en el ganado con EM, fue la destrucción de células inmunológicamente competentes (19). En ese entonces, se observó que si el mecanismo operativo era la tolerancia inmunológica, se esperaría que la falta de respuesta inmunitaria fuera específica contra el VDVB. En contraste, si la destrucción de las células inmunitarias estuviera operando también habría una depresión del sistema inmunológico (21). Sin embargo, la hipótesis de la tolerancia inmunológica fue demostrada en los 80's, década en la que la EM fue reproducida experimentalmente.

La investigación sobre la patogenia del complejo DVB-EM, como se conoció en las décadas de 1960 y 1970, se concentró en infecciones experimentales particularmente en bovinos gestantes y terneros recién nacidos. Se encontró que los abortos y varios trastornos teratógenos estaban asociados con infecciones intrauterinas por el VDVB (22,23). Tales experimentos también permitieron encontrar, que los terneros recién nacidos infectados congénitamente con VDVB no sobrevivían más de unos pocos meses, eventualmente sucumbiendo a lo que antes se describía como EM crónica (19). Se concluyó que los terneros que sufrían de estas infecciones intrauterinas estaban infectados de forma persistente, es decir, fueron catalogados como animales persistentemente infectados (PI) con el VDVB. Aún más importante, se encontró que los terneros PI tenían una anomalía inmunológica, ya que no produjeron anticuerpos detectables contra el VDVB. El descubrimiento de un toro PI sano con una cepa NCP del VDVB durante más de 2 años y con una notoria ausencia de anticuerpos anti-VDVB contribuyó también a la elucidación de las infecciones persistentes del VDVB (24).

En 1984 Brownlie *et al.* inocularon una cepa viral CP de un caso de DVB-EM en un animal PI, reproduciendo así la EM. Con ello, se estableció que la EM ocurre solo en animales PI después de la súper-infección con una cepa CP antigénicamente similar al VDVB ya presente de manera persistente en el animal (25). Adicionalmente, en 1989 se intentó reproducir una infección persistente al

inocular a una hembra gestante con una cepa CP, sin lograr obtener un animal PI; esto demostró que únicamente las cepas NCP son capaces de establecer dichas infecciones (26).

Más adelante en 1990, se reportaron presentaciones graves de la enfermedad en bovinos adultos y terneros en Canadá (27) y Estados Unidos (28), con manifestaciones clínicas como abortos, problemas respiratorios, malformaciones congénitas (29) y trombocitopenia severa que podía resultar fatal (30), así como fiebre y disminución en la producción láctea (28). Dichos reportes corresponden a los primeros casos de síndrome hemorrágico, cuyos agentes causales fueron identificados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y clasificados dentro del genotipo 2 del VDVB (31,32). Debido a la amplia variación en la virulencia de las cepas NCP, se sugirió el uso de técnicas mucho más sofisticadas para la caracterización de los virus y esclarecer con mayor precisión, las presentaciones de la enfermedad. En ese entonces, el VDVB-1 fue subdividido en dos subgrupos: el 1a, que comprende la cepa NADL, Oregon, y Singer, y el 1b el cual incluye las cepas NY-1 y Osloss (27); sin embargo, en el 2001, un estudio realizado con muestras de diferentes países demostró que el VDVB podía ser segregado en hasta 11 subgenotipos (33).

Por otro lado, en un estudio realizado en el 2004 caracterizó un nuevo pestivirus atípico denominado D32/00\_HoBi-like, aislado a partir de una muestra de SFB proveniente de Brasil (34) y que más tarde, fue tentativamente denominado VDVB-3. Dicho virus, particularmente diverso, se ha registrado en diferentes partes del mundo. En Suiza se detectó la presencia de la cepa CH-KaHo/cont, aislada a partir de un cultivo celular y de una muestra de suero de búfalo (35), en Brasil se aisló a partir de 2 fetos abortados (36) y más adelante las cepas SV713/09, SV241/10 y SV311/10 fueron aisladas, la primera proveniente de semen de bovino y las otras 2, de suero de animales que presentaron alteraciones reproductivas (37). También se ha detectado como contaminante de SFB. La cepa SVA/cont08 se aisló a partir de un lote de SFB proveniente de Suramérica (38), y al realizar el análisis filogenético se agrupó dentro del clado del VDVB-3 junto con la cepa Th/04\_khonKaen identificada en

Tailandia a partir de suero de un ternero infectado naturalmente (39) y la cepa IZPLV\_To detectada en animales y lotes de SFB (40). Los reportes continuaron en Italia al aislar la cepa Italy-1/10-1 a partir de un brote de enfermedad respiratoria en el ganado (41) y con la presencia de HoBi-like en ganado infectado naturalmente en India (42) y Bangladesh (43), así como en búfalos de agua en Argentina (44) y más recientemente en ganado de Egipto (45).

Actualmente, se sabe que el VDVB tiene una distribución mundial y los diversos estudios filogenéticos que se han llevado a cabo han permitido determinar su caracterización y segregación (46). Las diferencias entre los genomas del VDVB no sólo se encuentran en una región en particular, sino que también pueden ser encontradas a lo largo de todo el genoma (47). Debido a esto, para la genotificación de los VDVB, se ha utilizado la región no codificante 5'UTR y las regiones codificantes Npro y E2 (48). La región 5'UTR es una región altamente conservada entre los Pestivirus que contiene tres regiones variables denominadas V1, V2 y V3 (49). Debido a estas características es común utilizarla para la detección y caracterización del VDVB. Por un lado las regiones conservadas permiten la detección de los Pestivirus (50), y por otro lado las regiones variables permiten identificar los genotipos y subgenotipos del VDVB (51).

Recientemente, se sabía que el VDVB-1 tiene 21 subgenotipos que van del VDVB-1a al VDVB-1u, el VDVB-2, al igual que HoBi-like, tienen 4 subgenotipos que van del subgenotipo a-d (44); sin embargo, se reportó la detección de un nuevo subgenotipo en China, denominado 1v (53). La diversidad del virus se debe en gran parte a la alta tasa de mutabilidad que tiene el virus (54). Aunado a lo anterior, las actividades pecuarias como el manejo del ganado, promueven la diseminación del virus así como su establecimiento ya sea por su movilización (55), la falta de aplicación de pruebas diagnósticas para detectar aquellos animales tanto inmunotolerantes como inmunocompetentes, así como la falta de vacunación (56). Las iatrogenias durante el manejo del ganado como inseminación (57) o trasplantes embrionarios también son factores que pueden promover la diseminación del virus (58). Así mismo, se han llegado a reportar brotes de la enfermedad por vacunación al utilizar vacunas de virus activo

contaminadas con el VDVB (59). Esto ocurre al producir biológicos en donde SFB contaminado es utilizado como suplemento de líneas celulares en donde se producen vacunas (60). Por lo tanto, el uso de productos vacunales contaminados tiene graves repercusiones cuando se aplica en el ganado bovino al generar problemas respiratorios, digestivos y reproductivos (59). Lo anterior, deriva en grandes pérdidas económicas a los productores pecuarios (61). Además, el VDVB contaminante en líneas y cultivos celulares puede causar alteraciones en los resultados de investigaciones en donde se utilizan estos productos biológicos (62).

## 1.2 CARACTERÍSTICAS DEL VDVB

### 1.2.1 Clasificación taxonómica

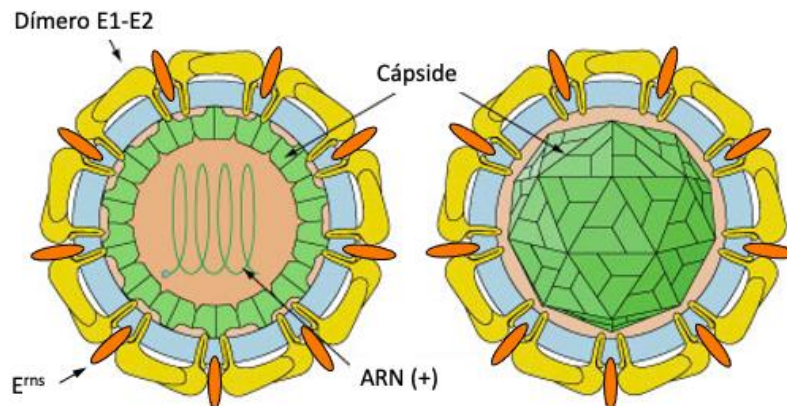
El VDVB pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Pestivirus* junto con el VFPC, VEF, el pestivirus del antílope Pronghorn, Bungowannah, el pestivirus de la rata, el pestivirus de la jirafa, HoBi-like, el pestivirus Aydin-like y el pestivirus atípico porcino. Recientemente, en el 2019 el ICTV asignó una nueva clasificación en la cual se agrupan las especies como Pestivirus A a la K, descrita a continuación en el cuadro 1 (63).

| Familia <i>Flaviviridae</i>    |                                         |             |
|--------------------------------|-----------------------------------------|-------------|
| — Genus: <i>Pestivirus</i>     | Nombre común                            | Abreviatura |
| ★ Species: <i>Pestivirus A</i> | Virus de la diarrea viral bovina 1      | VDVB-1      |
| Species: <i>Pestivirus B</i>   | Virus de la diarrea viral bovina 2      | VDVB-2      |
| Species: <i>Pestivirus C</i>   | Virus de la fiebre porcina clásica      | VCSF        |
| Species: <i>Pestivirus D</i>   | Virus de la enfermedad de las fronteras | VBD         |
| Species: <i>Pestivirus E</i>   | Pestivirus Pronghorn del antílope       |             |
| Species: <i>Pestivirus F</i>   | Pestivirus porcino (Bungowannah)        |             |
| Species: <i>Pestivirus G</i>   | Pestivirus de la jirafa                 |             |
| Species: <i>Pestivirus H</i>   | HoBi-like                               |             |
| Species: <i>Pestivirus I</i>   | Pestivirus Aydin-like                   |             |
| Species: <i>Pestivirus J</i>   | Pestivirus de la rata                   |             |
| Species: <i>Pestivirus K</i>   | Pestivirus atípico porcino              | APPV        |

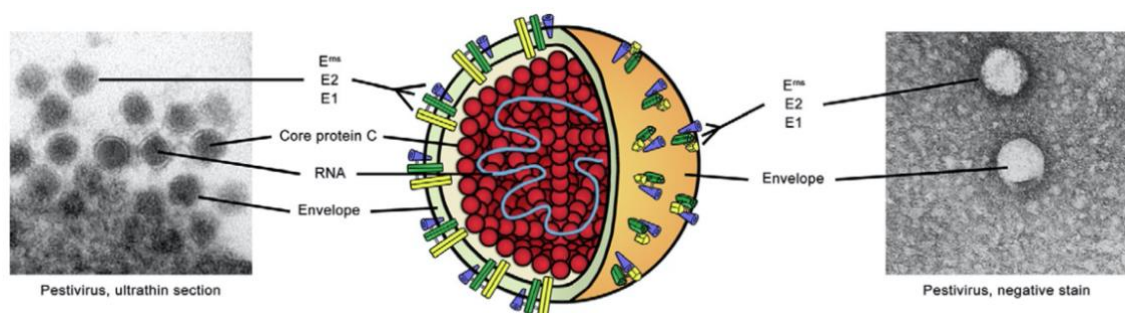
**Cuadro 1.** Clasificación actual de los *Pestivirus*. Se describe la nomenclatura asignada por el ICTV, el nombre común de los virus y su abreviatura. Tomado del ICTV (64).

### 1.2.2 Morfología del virión

El VDVB es un virus envuelto con una bicapa lipídica pleomórfica que mide de 40-60 nm de diámetro aproximadamente (64). La envoltura viral contiene las 3 glicoproteínas  $E^{ms}$ , E1 y E2. Estas recubren la cápside la cual se encuentra constituida por subunidades de la proteína C (Fig. 1 y 2) (65).



**Figura 1.** Esquema del VDVB. El genoma está cubierto por la cápside y ésta a su vez se encuentra envuelta por una bicapa lipídica en donde están embebidas las glicoproteínas estructurales E1, E2 y  $E^{ms}$ . Modificado de [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/39.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/39.html)

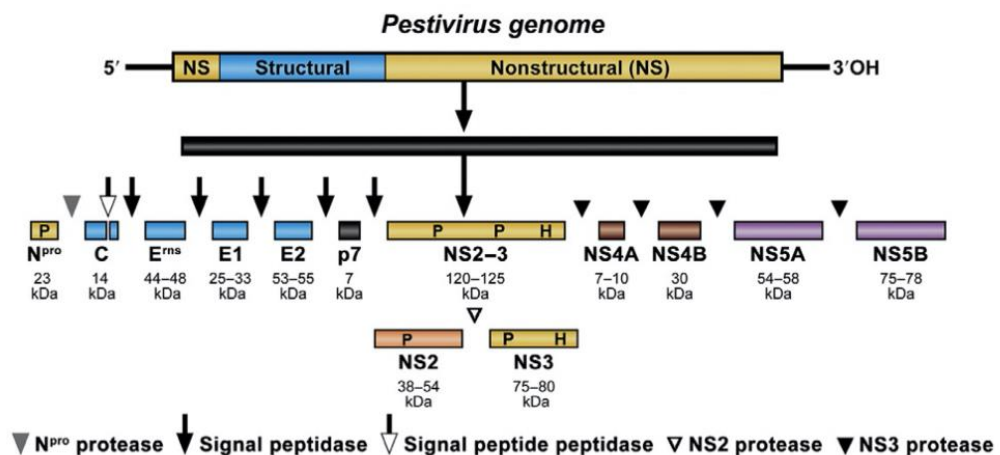


**Figura 2.** Características básicas de los pestivirus. La figura muestra un diagrama de una partícula viral flanqueada por imágenes obtenidas por microscopía electrónica (VDVB en sección ultrafina a la izquierda; VFPC en tinción negativa a la derecha). Tomado de The Molecular Biology of Pestiviruses. Tauz et al. 2015.

### 1.2.3 Genoma de los pestivirus

Los *Pestivirus* tienen un genoma ARN de cadena sencilla y sentido positivo con una longitud de 12.3-13 kilobases. Está compuesto por un marco de lectura abierto u ORF (*open reading frame*) flanqueado por regiones no traducidas o UTR (*untranslated regions*) (64); una región 5'UTR con alrededor de 370-385 nucleótidos (66) y una región 3'UTR con 190-270 nucleótidos (67) (Fig.3). Debido a que la replicación del genoma y la traducción de las proteínas virales de los pestivirus es cap-independiente, la región 5' terminal tiene una estructura secundaria llamada sitio interno de entrada al ribosoma o IRES (*internal ribosome entry site*) requerida para el inicio de la traducción (68) supliendo la función de la región cap metilguanosina (69). Adicionalmente, contiene señales necesarias para modular los procesos de replicación y de traducción de las proteínas virales (70).

La región 3'UTR contiene un sitio indispensable para la replicación viral (67) y aunque carece de cadena poli-A, tiene en su lugar una cadena corta de poli-C (71).



**Figura 3.** Esquema del genoma de los *Pestivirus*. El procesamiento de la poliproteína por las proteasas especificadas en la parte inferior da lugar a las proteínas virales. P, dominio de proteasa; H, helicasa. Tomado de The Molecular Biology of Pestiviruses. Tausz *et al.* 2015.

### 1.2.4 Proteínas virales

La poliproteína codificada por el ORF, está conformada por aproximadamente 4,000 aminoácidos y es escindida co-traduccionalmente y post-traduccionalmente por proteasas celulares y virales (64). Las proteínas resultantes se clasifican en estructurales y no estructurales; las primeras están contenidas en la porción N-terminal de la poliproteína y corresponden a la proteína C, E<sup>ns</sup>, E1 y E2. Las no estructurales N<sup>pro</sup>, p7, NS2-NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, están contenidas en la porción restante de la poliproteína (72). En comparación con los otros géneros dentro de la familia *Flaviviridae*, los pestivirus codifican dos proteínas únicas, N<sup>pro</sup> y E<sup>ns</sup> (73).

#### 1.2.4.1 Proteínas estructurales

Subunidades de la proteína C conforman la cápside del virión la cual tiene la función de proteger el genoma viral (74). E<sup>ns</sup> es una de las tres glicoproteínas de la envoltura viral, que posee una actividad ARNasa intrínseca (75). La proteína E1 es una glicoproteína de membrana que forma heterodímeros con la proteína E2 mediante enlaces disulfuro (74) y finalmente, la glicoproteína E2 es la proteína estructural inmunodominante que posee epítomos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra el VDVB (76).

#### 1.2.4.2 Proteínas no estructurales

La proteína N<sup>pro</sup> es la primera codificada por el ORF y posee una actividad autoproteolítica, responsable de su liberación del resto de la poliproteína (77). La proteína P7, que es codificada después de la proteína E2, es escindida por proteasas celulares (78), hipotéticamente el complejo E2-p7 no es esencial para la replicación del ARN viral ni para la generación de progenie viral infecciosa, mientras que la P7 libre se requiere selectivamente para esta última función (79). Seguido de P7, se encuentra la proteína NS2-3, es una serina proteasa, cuya actividad reside en la porción NS3 de la proteína y su escisión de NS2 no afecta su actividad (80). Esta proteasa es responsable del procesamiento de NS2-3 para dar lugar a NS2 y NS3 (81). NS3 también posee actividad de ARN helicasa y NTPasa estimuladas por ARN (82) siendo estas actividades esenciales para la viabilidad del virus (83). De manera subsecuente, se encuentra la proteína NS4A,

la cual actúa como cofactor de la actividad de serina proteasa NS3 (84) y posteriormente la proteína NS4B, que funge como un componente del complejo de replicación (85) y un importante modulador de citopatogenicidad (86). La proteína NS5A es una proteína fosforilada y también desempeña funciones en la replicación del ARN y la morfogénesis del virión (87) mientras que la última proteína, NS5B tiene secuencias características de una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (88) y muestra actividad polimerasa *in vitro* (89).

### **1.2.5 Genotipos**

Con base en su secuencia genética, el VDVB se diferencia en 2 genotipos; VDVB-1 y VDVB-2 (27); sin embargo, en estudios recientes se ha evidenciado la existencia de un tercer pestivirus tentativamente perteneciente a esta especie llamado VDVB-3 o HoBi-like (90).

Los virus agrupados bajo el nombre de VDVB son altamente heterogéneos, y se han descrito diferencias entre genotipos mediante ensayos de unión a anticuerpos monoclonales (30,81). Existe una alta variabilidad de estos virus ARN debido a que son altamente mutables. Dichas modificaciones genómicas implican mutaciones puntuales o la recombinación de ARN. Este último puede ser homólogo (que implica la recombinación de ARN viral -auto ARN-) o no homólogo (que involucra la recombinación de su ARN con el de otro VDVB o con ARN del huésped infectado) (92). Las mutaciones puntuales ocurren con regularidad en virus de ARN, cuya frecuencia de mutación se estima que va de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  sustituciones por base (93). Esto significa que cualquier base dada en el genoma viral experimentará una mutación por cada 10,000 nucleótidos polimerizados, lo que trae como resultado la generación de cuasiespecies (94). La alta frecuencia de mutaciones puntuales es principalmente atribuible a las ARN polimerasas virales responsables de replicación del ARN viral ya que son propensas a errores, debido a que carecen de actividad exonucleasa (85,82).

La alta tasa de mutación, la tendencia a la recombinación y la presión selectiva de las respuestas inmunitarias estimuladas por la infección natural o la vacunación han derivado en la generación de una amplia gama de variantes

genéticas y antigénicas del VDV-B. Las variantes genéticas se pueden agrupar en función de la homología de secuencias del genoma (30,62). De este modo, actualmente se reconocen 22 subgenotipos del VDV-B-1 y 4 del VDV-B-2 así como del VDV-B-3, descritos a continuación en el cuadro 2.

| Genotipos y subgenotipos del VDV-B |                    |            |            |
|------------------------------------|--------------------|------------|------------|
| Gentipo                            | VDVB-1             | VDVB-2     | HoBi-like  |
| Subgenotipo                        | 1a-1u (46) 1v (53) | 2a-2d (46) | 3a-3d (52) |

**Cuadro 2.** Resumen de los subgenotipos del VDV-B reconocidos actualmente.

Las variaciones entre las cepas de VDV-B se pueden evaluar mediante diferentes métodos, que incluyen reacciones con anticuerpos monoclonales, pruebas de neutralización cruzada (86,81) y la comparación de secuencias de nucleótidos (97). Los análisis filogenéticos de secuencias genéticas parciales y completas proporcionan información más detallada que los estudios basados en reacciones con anticuerpos y permiten la detección y discriminación rápida de subgenotipos de VDV-B-1, VDV-B-2 y VDV-B-3 así como la identificación de nuevos subgenotipos (30,41). Por medio de análisis filogenéticos, es posible realizar dicha clasificación y para ello, la región 5'UTR es la más comúnmente utilizada debido a que contiene secuencias altamente conservadas favorables para su caracterización (98).

Un estudio realizado en 2017 sugirió que la distribución mundial del VDV-B-1, incluyendo un total de 6117 cepas (88,2%) es significativamente más amplia que la distribución de las cepas del VDV-B-2, con 822 cepas reportadas. La extensa diversidad genética del VDV-B reflejada por el número de subgenotipos detectados se ha descrito para varios países europeos, así como para China y Turquía (46). Se ha sugerido que esta alta diversidad genética podría estar relacionada, con políticas de importación de animales de estos países (89,90). En contraste con muchos países europeos y asiáticos, la diversidad del VDV-B-1 está considerablemente menos desarrollada en el continente Americano, Australia y África, siendo los subgenotipos VDV-B-1m, 1n, 1o, 1p, 1q y 1v los únicos que se han detectado en Asia (91,45). Del mismo modo, los subgenotipos VDV-B-1f, 1g, 1h, 1k, 1l, 1r, 1s y 1t no se han reportado

en países fuera de Europa (46). Por otra parte, la presencia de HoBi-*like* se ha descrito ampliamente en Brasil desde el 2004 con la cepa D32/00\_‘HoBi’ (36), en Suiza en 2005 con la cepa CH-KaHo/cont (35), en Tailandia en 2009 con la cepa Th/04\_KhonKaen (39), Suecia en el mismo año con la cepa SVA/cont-09 detectado en suero fetal bovino procedente de sudamérica (38), en Italia en el 2010 cepa IZSPLV\_To (40) y en 2011 con la cepa Italy-1/10-1 (41), en Bangladesh en el 2014 (43), en India en 2014 (42), en China en 2016 (102) y más recientemente en Japón en 2018 (103), Argentina en 2019 (104), Turquía en 2019 (105) y en Egipto en 2022 (45) .

### **1.2.6 Biotipos**

Los pestivirus se pueden dividir en dos biotipos que se diferencian por su actividad en cultivos celulares permisivos, estos son: citopático (CP) y no citopático (NCP) (96,97), aunque esta característica no puede ser identificada con pruebas serológicas (29).

La principal diferencia entre los biotipos CP y NCP es la la escisión de la proteína NS2-3 en NS2 y NS3, como resultado de diversos eventos genéticos como:

- Inserciones de secuencias de ARN de la célula hospedadora codificantes de ubiquitina en NS2-3 que como consecuencia se promueve su escisión (108).
- Duplicación de secuencias genéticas del virus insertadas en la región codificante NS2-3 induciendo la escisión de dicha proteína (109).
- Duplicación del gen NS3 del VDVB corriente abajo (110).
- Mutaciones puntuales en el gen NS2-3 (111,112).
- Expresión de NS3 en un genoma ARN viral defectuoso (113).
- Reordenamiento del gen p125/p80 (114).
- Recombinación de fragmentos de ARN cortos entre cepas NCP y CP (115,116).

Estas alteraciones en el genoma derivan en la expresión NS3, proteína que es considera un marcador molecular de los virus CP y la causa del efecto

citopático (117) y asociada al desarrollo de la EM (113). Aunque ambas proteínas, NS2 y NS3, están presentes en los dos biotipos hay una mayor concentración detectable de NS3 en infecciones causadas por los biotipos CP que en los NCP (118). Los virus CP generan vacuolización y muerte celular, mientras que los virus NCP no ocasionan cambios visibles en el cultivo celular (119). Esto no implica que los biotipos NCP no sean patogénicos, ya que la citopatogenicidad no está relacionada con su virulencia; por el contrario, la mayoría de las cepas virulentas, son del biotipo NCP (120) provocando las principales pérdidas asociadas a la presentación de la enfermedad aguda (61). Además las cepas NCP, son el biotipo predominante en el campo (119) y el único capaz de originar una infección persistente en los animales, convirtiéndose en las fuentes primarias de la propagación horizontal del virus (121). Lo anterior, debido a la capacidad que tiene el VDVb NCP para atravesar la barrera placentaria (122) y modular la inducción de interferón tipo I evitando la apoptosis de la célula infectada (123) permitiendo que el VDVb se replique en el animal infectado (27,121).

Por otro lado, únicamente las cepas NCP del genotipo 2, se han asociado a una presentación clínica severa llamada síndrome hemorrágico (30); mientras que en la forma letal de infección, conocida como enfermedad de las mucosas, ambos biotipos están presentes en el animal afectado (23,124).

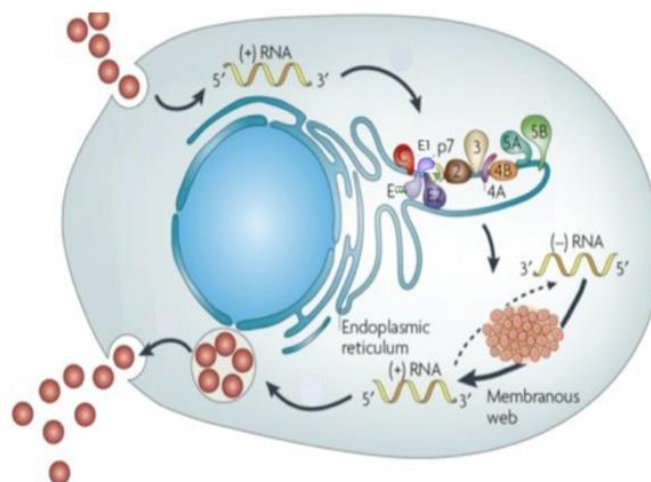
### **1.2.7 Replicación**

La unión y la entrada del VDVb a la célula hospedadora involucra una serie de eventos, comenzando con la adherencia del virión con los receptores celulares específicos. Las glicoproteínas virales E<sup>ms</sup> y E2 (125,126) interactúan con los glucosaminoglicanos de la superficie celular (127) y con las proteínas de membrana (128,129) CD46 y LDLr (low-density-lipoprotein- receptor) que son los receptores identificados para el VDVb (130). Una vez que el virión ingresa a la célula por endocitosis mediante la formación de vesículas cubiertas con clatrina (131), comienza el proceso de fusión dependiente de pH de la membrana de la vesícula endocítica con la proteína E2 de la envoltura viral (132). Posteriormente,

la cápside viral es degradada por actividad de proteasas celulares liberando el genoma del VDVB en el citoplasma (133).

El inicio del proceso de traducción está mediado por el IRES, y se realiza en la ausencia de factores de iniciación de la traducción adicionales. Es decir, la traducción del genoma del VDVB ocurre sin que haya una transcripción previa debido a que el genoma del VDVB actúa como ARNm. Como resultado, se genera una piloproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos que es escindida por proteasas celulares y virales, dando origen a las proteínas estructurales y no estructurales descritas anteriormente (134). Por acción de los componentes celulares y funcionalmente vinculadas al proceso de traducción, las proteínas virales no estructurales se ensamblan en un complejo de replicasa funcional para catalizar la transcripción de ARN(+) en una cadena complementaria de ARN(-). Las hebras de ARN negativas proporcionan una plantilla para que el complejo de replicasa sintetice moléculas de ARN de sentido positivo adicionales, utilizando un modelo de replicación asimétrico semiconservativo (135).

Finalmente, el ensamblaje de las proteínas se realiza en el retículo endoplasmático (RE) y las nuevas partículas virales adquieren su envoltura del RE y de otras membranas intracelulares de las vesículas citoplasmáticas (136) seguido de su liberación por exocitosis (Fig.4) (137).



**Figura 4.** Representación esquemática del ciclo de replicación del VDVB. Modificado de Moradpour D. *et al.* 2007, *Nature Reviews Microbiology* 5, 453-463.

## **1.3 EPIDEMIOLOGÍA**

### **1.3.1 Prevalencia del VDVB**

La mayoría de los datos de prevalencia del VDVB en varios países no son directamente comparables debido a los diferentes criterios de selección de animales. Sin embargo, existen diferencias en la prevalencia e incidencia de la infección por el VDVB entre países y regiones asociadas a factores como la densidad de ganado en la zona o el tamaño de la manada (138).

En la actualidad se sabe que el VDVB-1 tiene una distribución mundial. Un estudio realizado en 2017 el cual incluyó el análisis de un total de 6117 secuencias del VDVB (88,2%) sugirió que su distribución, es significativamente más amplia en comparación con las cepas del VDVB-2, con 822 cepas (11.8%). La extensa diversidad genética del VDVB se ve reflejada por el número de subgenotipos detectados que se han descrito en varios países europeos. Así mismo, en contraste con los continentes Europeo y Asiático, la variabilidad genética del VDVB-1 está considerablemente menos desarrollada en el continente Americano, Australia y África (46).

### **1.3.2 Situación en México**

El primer reporte de VDVB en México fue en 1975, el cual reveló una seropositividad del 75% en vacas con antecedentes clínicos de infertilidad, abortos y enfermedades respiratorias (139). Posteriormente, en 2016 se realizó un estudio en estados de la República Mexicana en donde se encontró una seroprevalencia del virus de entre el 55% en Sinaloa y hasta un 98% en Aguascalientes (140).

De manera consecutiva, un estudio realizado en bovinos de 6 estados del país, reveló la presencia de cuatro subgenotipos de VDVB: 1a, 1b, 1c y 2a, sin evidencia de la presencia de virus HoBi-like (141). Un patrón de subgenotipos prevalentes similar al descrito en América del Norte (27,32). Así mismo, en un estudio realizado en fauna silvestre se describió y aisló al genotipo 1b a partir de un venado gamo clínicamente sano (142).

En México, la DVB se considera una enfermedad endémica de distribución nacional registrada por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) y categorizada como una enfermedad no regulada en México, por lo que no se han implementado programas de control o erradicación y las actividades de prevención no son obligatorias. Los programas de control no oficiales o parciales se basan únicamente en llevar a cabo, de manera voluntaria, procedimientos de buenas prácticas ganaderas como diagnóstico oportuno de la enfermedad, eliminación de animales seropositivos y el seguimiento de planes de vacunación. No obstante, se deben realizar notificaciones mensuales obligatorias al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) (143).

Debido a la falta de coordinación e implementación de estrategias para el control de la enfermedad, no se cuentan con datos que permitan conocer con precisión la distribución geográfica del VDVB, la tipificación de sus variantes, su incidencia y prevalencia, así como la proporción de los animales PI. De la misma forma, se desconoce el impacto económico que genera la enfermedad, ya que tampoco se han llevado a cabo estudios financieros para estimarlo.

Existen estudios realizados en animales no vacunados, donde calculan una seroprevalencia de entre 76.2% (144) a 81.27% (145); el nivel elevado de seropositividad en estos estudios puede indicar una infección reciente o la presencia de un animal PI dentro de la población estudiada (146). Sin embargo, se ha registrado un porcentaje de seroprevalencia más bajo en el estado de Yucatán con 14%, lo cual refleja una exposición natural al VDVB (147).

La prevención y el control nacional de la DVB depende principalmente de la vacunación, utilizando vacunas de virus activo modificado y de virus inactivado, las cuales se formulan con cepas de referencia de Estados Unidos tales como la NADL, Singer, Oregon C24V, 296c, NY-1 y New York-93. Así mismo, se incluyen ambos biotipos con diversas combinaciones y junto con otros virus de bovinos como el virus de la parainfluenza-3 bovina, herpesvirus bovino tipo 1 y virus respiratorio sincitial bovino; sin embargo, no hay información oficial registrada con respecto a la cobertura y eficacia de la vacunación en México.

### **1.3.3 Impacto económico**

Como se mencionó previamente, en México no existen estudios acerca del impacto económico, por lo que se toman como referencia registros de otros países. En Nueva Zelanda la pérdida total que se estimó atribuible a la infección con VDVB es de 87 dólares neozelandeses por vaca al año en rebaños afectados y 44,5 millones de dólares neozelandeses por año para la industria láctea. Dicho estudio se basó en un estimado de 14,6% de rebaños afectados. La estimación de pérdidas económicas no incluye el costo agregado y consecuencias negativas por la infección, como una mayor incidencia de enfermedades de la producción debido a inmunosupresión inducida por la DVB (148).

Por otra parte, en Reino Unido se realizó una revisión sistemática de 31 artículos, publicados entre 1991 y 2015, que abordan el impacto económico de DVB. El impacto económico reportado varía de 0 euros a 552 euros por vaca por año (2370 euros incluyendo valores atípicos). Este rango representa situaciones de la enfermedad endémica o subclínica observadas en rebaños con infección por VDVB y situaciones epidémicas o agudas graves, observadas con mayor frecuencia en manadas sin previa exposición al virus. Por lo tanto, el resultado de la infección depende del estado inmunitario del animal y la virulencia de la cepa. Las variaciones en las cifras del impacto económico de DVB se relacionan con estos factores así como de patogenicidad, junto con la variedad de impactos monitoreados (149).

### **1.3.4 Diagnóstico**

El diagnóstico de la infección por el VDVB puede ser complejo debido al periodo de tiempo entre la infección y el inicio de los signos clínicos. A pesar de metodologías actuales utilizadas para el diagnóstico de la DVB, la detección de infecciones agudas, así como la detección de animales PI puede ser un escenario desafiante (150).

#### **1.3.4.1 Detección del VDVB**

En esta sección, se enlistan las técnicas de diagnóstico recomendadas por la OIE, agrupadas según su objetivo:

**I) Aislamiento viral.** Cuando se lleva a cabo utilizando un patrón de calidad, el aislamiento del VDVB es muy fiable. Todos los componentes biológicos que se empleen en los cultivos celulares deben analizarse, y solo se utilizarán si se demuestra que están libres de VDVB y de anticuerpos contra este virus. En función del tipo de muestra y del objetivo de las pruebas, es probable que el aislamiento del virus requiera uno o más pases por cultivos celulares. Adicionalmente, para detectar el crecimiento de virus NCP se realizan técnicas de inmunomarcaje (inmunofluorescencia o tinción con peroxidasa) (150).

**II) Detección del ácido nucléico.** La RT-PCR de punto final se ha utilizado para la detección de ARN del VDVB. La alta sensibilidad analítica permite adoptar estrategias para analizar combinaciones de varias muestras o analizar leche de tanque a granel. Es un método rápido y fiable que también puede utilizarse para analizar otro tipo de muestras como SFB o el sobrenadante de cultivos celulares. Aunque la RT-PCR en tiempo real tiene una sensibilidad muy alta y puede aplicarse al análisis de los materiales biológicos que se utilicen para la producción de vacunas, es necesario interpretar los resultados con cautela porque la detección de ARN del virus no implica por sí sola la presencia de virus infectivo (150).

**III) Analisis inmunoenzimático para la detección del antígeno.** La detección de antígeno mediante ELISA se ha convertido en un método muy utilizado para la detección de animales PI a nivel individual. Es importante destacar que estas pruebas no están diseñadas para analizar muestras de semen ni materiales biológicos que se empleen en las pruebas o en la fabricación de vacunas. Se han publicado varios métodos de ELISA para la detección de antígeno y existen a la venta diversos kits comerciales. La mayoría se basan en el principio del ELISA de tipo sándwich, con un anticuerpo de captura unido a una fase sólida y un anticuerpo detector conjugado a un sistema de señal, como la peroxidasa. Así mismo, se han descrito sistemas basados en anticuerpos monoclonales y policlonales, identificando la proteína NS2-3 o E<sup>rns</sup> (150).

**IV) Inmunohistoquímica.** Los métodos basados en el marcaje enzimático permiten detectar el antígeno del VDVB a partir de los tejidos en donde se replica el virus como en epitelio gastrointestinal, respiratorio, digestivo y en algunos casos en piel, en donde se utilizan anticuerpos monoclonales contra la proteína E2 o NS-3. Es importante que los reactivos y los procedimientos que se utilicen estén totalmente validados y que se elimine la reactividad inespecífica (150).

#### **1.3.4.2 Pruebas serológicas**

**I) Neutralización viral (NV).** El tipo de cepa viral que se incluya en la NV es muy importante, pese a que ninguna cepa va a resultar ideal para todos los casos, en la práctica deberá escogerse una que detecte la mayor cantidad posible de reacciones serológicas en la población bovina local. Por motivos de facilidad de lectura, para las pruebas de NV la mayoría de laboratorios utiliza cepas de VDVB citopáticas y adaptadas al laboratorio, dos de las más utilizadas son las cepas Oregon C24V y NADL. No obstante, ahora se cuenta con técnicas de inmunomarcaje que permiten una detección sencilla del crecimiento o la neutralización de cepas no citopáticas (150).

**II) Análisis inmunoenzimático.** Se pueden utilizar pruebas indirectas o de bloqueo utilizando kits comerciales. Como en la NV, los ELISA configurados con el antígeno de un genotipo del VDVB pueden no detectar de manera eficiente anticuerpos inducidos por otro genotipo. Por lo tanto, las pruebas deben escogerse por su capacidad de detectar anticuerpos contra el perfil de genotipos y de cepas que circule en el país en el que se van a utilizar (150)

### **1.4 PATOGENIA**

El VDVB tiene tropismo por células mitóticamente activas como linfocitos, pero también por monocitos, macrófagos (151) y células epiteliales como las de la mucosa oral, nasal y tonsilas palatinas, donde comienza la replicación viral. Posteriormente las células infectadas diseminan el virus hacia los linfonodos y otros tejidos produciendo una viremia en el resto del organismo (152). El periodo de incubación promedio del virus en todas las presentaciones es de 5-7 días aproximadamente (153).

En diversos estudios se ha demostrado que después de la inoculación intranasal a terneros con cepas VDVB-1 y VDVB-2 de baja virulencia, los animales no desarrollaron signos evidentes de enfermedad. Sin embargo, sí se ha detectado pirexia leve durante 1 a 2 días. Después del sitio inicial de la replicación del virus, éste se encontró en los ganglios linfáticos y las placas de Peyer, posteriormente en el bazo y el timo (154). Las cepas de baja virulencia predominan en los folículos linfoides y la corteza del timo, donde se asocian con linfocitos y células estromales. Fuera de los tejidos linfoides, se ha descrito una infección multifocal en la mucosa intestinal. La marcada diferencia en el grado de recuperación de los animales, señala la importancia de las condiciones individuales del hospedador (31,153–155).

La propagación inicial de cepas de alta virulencia es similar a la de las cepas de baja virulencia (154), pero la cantidad de antígeno viral en los tejidos supera rápidamente la causada por las cepas de baja virulencia; además, no se limita a los folículos de los tejidos linfoides, sino que se extiende a las áreas de localización de células T diseminándose a la médula ósea. Su presencia en células mieloides y megacariocitos se correlaciona con una disminución en el número de trombocitos. El VDVB altamente virulento se encuentra regularmente en los tejidos linfoides, la mucosa del tracto digestivo superior e inferior, el tracto respiratorio y los tejidos endocrinos. Eventualmente, en todos los órganos se puede detectar al antígeno viral al menos en el intersticio, lo que indica una diseminación hematológica. A pesar de la amplia distribución del antígeno viral, la presencia de lesiones está restringida y se observan primordialmente en los tejidos linfoides (156–159). Adicionalmente, las cepas altamente virulentas producen necrosis del epitelio en el tracto digestivo y en las criptas intestinales, lo que genera lesiones erosivas o ulcerativas a lo largo del tracto digestivo (140,136–138). Los signos clínicos después de la infección con cepas del VDVB de alta virulencia son graves, pero a menudo inespecíficos y consisten en anorexia, depresión, fiebre alta y diarrea en la mayoría de los casos (28,29,136,141) y algunos animales desarrollan hemorragias graves (28,29). El sangrado se ha asociado con infecciones agudas graves para las cuales se acuñó el término de síndrome hemorrágico, aunque no ocurre con regularidad.

Otros hallazgos consistentes son linfopenia progresiva severa y trombocitopenia de moderada a severa (142,138). Se sabe que las cepas de VDVB altamente virulentas aisladas de la mayoría de los brotes que tuvieron un impacto económico severo en América del Norte pertenecían a VDVB-2 (32). Sin embargo, una investigación adicional reveló que el VDVB-2 abarca no solo las cepas de alta virulencia, sino también las de moderada a baja virulencia (163).

Diversas lesiones se han asociado a la presencia de los biotipos CP o NCP. Aunque ambos biotipos del VDVB, juntos o separados, inducen lesiones en el sistema linfoide, entérico, respiratorio y reproductivo las manifestaciones clínicas son variadas (29,107). La hipoplasia cerebelar y defectos oculares como cataratas, degeneración de la retina y neuritis óptica en terneros recién nacidos, forman parte de las lesiones provocadas después de la infección por VDVB NCP en vacas gestantes (22); así como el nacimiento de terneros con defectos en el cerebelo, cuyas madres fueron inoculadas a los 79-150 días de gestación con un VDVB NCP (23).

Ya que las manifestaciones clínicas varían dependiendo de la cepa viral, el hospedador y su estado inmunológico, reproductivo, edad, así como la etapa de gestación en el caso de hembras gestantes y concurrencia de otras infecciones, este tema se continuará de acuerdo con las diferentes presentaciones clínicas que se pueden desarrollar.

#### **1.4.1 Transmisión**

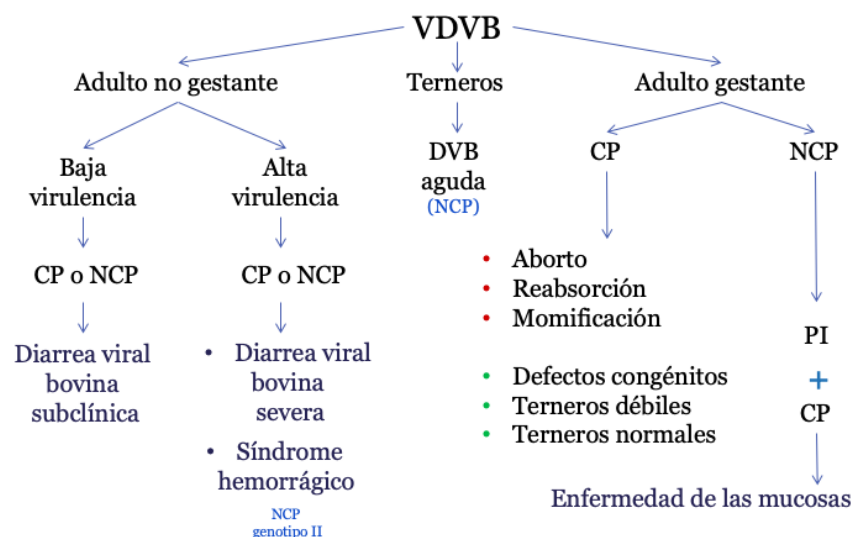
El VDVB se transmite de forma horizontal, tanto directa e indirectamente, como de forma vertical (138). La transmisión horizontal directa consiste en el contacto directo entre animales susceptibles y secreciones de animales infectados, como saliva, descargas óculo-nasales, secreciones vaginales, orina, heces, semen y leche (153). Adicionalmente, se ha reportado la transmisión a través de inseminación artificial (164) y por transferencia de embriones infectados con el VDVB (165). La transmisión indirecta se puede dar de manera iatrogénica mediante el uso de material quirúrgico y de manejo contaminado con el VDVB. Por ejemplo, en la palpación transrectal (166) por fómites como pinzas nasales

(29) y agujas contaminadas (167). Otro vía importante de transmisión es el uso de vacunas con virus activo modificadas contaminadas con el VDVB (61).

Por otra parte, la transmisión vertical ocurre en hembras gestantes susceptibles, y debido a la capacidad que tiene el virus para atravesar la barrera placentaria. Sin embargo, las consecuencias generadas por la infección con el VDVB en el producto en gestación son diversas y dependerán de la etapa de gestación en la que ocurra y del biotipo de la cepa infectante. Dichas consecuencias pueden ser: muerte embrionaria, aborto, momificación, reabsorción, malformaciones congénitas, nacimiento de terneros débiles, nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI) y nacimiento de terneros sanos seropositivos (3).

### 1.4.2 Presentaciones clínicas

La secuencia temporal y la magnitud de los trastornos clínicos muestran una gran variabilidad. Los factores involucrados en las presentaciones clínicas están asociados al estado inmunológico del animal afectado, la etapa de gestación de los animales en el momento de la infección y la virulencia de la cepa infectante. Sin embargo, es posible observar ciertos patrones que han permitido proponer una clasificación para las presentaciones clínicas (138), la cual se describe a continuación y se resume en la figura 6.



**Figura 6.** Propuesta de presentaciones clínicas causadas por el VDVB.

### **1.4.2.1 Bovinos no gestantes**

#### **1.4.2.1.1 Diarrea viral bovina subclínica**

La infección por VDVB en bovinos seronegativos e inmunocompetentes tendrá como resultado, en la mayoría de los casos, una infección subclínica. Se ha estimado que del 70% al 90% son de este tipo (3), en las cuales hay un ligero incremento en la temperatura corporal y leucopenia que pasan desapercibidas (168); no obstante, la resolución de la enfermedad la pueden llevar a cabo sin tratamiento. Este tipo de infecciones subclínicas explican la alta prevalencia de bovinos seropositivos al VDVB (3).

#### **1.4.2.1.2 Diarrea viral bovina aguda**

Cuando la infección se vuelve clínica, la enfermedad ya se conoce como diarrea viral bovina (DVB). En rebaños susceptibles, pueden producirse brotes de diarrea en animales de entre 6 meses y 2 años de edad (169). Se caracterizan por una alta morbilidad y por lo general la letalidad es baja. Después de 2 a 3 semanas de la infección se producen anticuerpos contra el VDVB que persisten de por vida (170). Los signos incluyen depresión, anorexia, secreción oculonasal, ocasionalmente lesiones orales caracterizadas por erosiones y ulceraciones, diarrea y disminución de la producción de leche en el ganado lactante. Puede observarse una frecuencia respiratoria rápida, que es compatible con neumonía (171).

#### **1.4.2.1.3 Diarrea viral bovina severa**

Existe una forma aguda severa de la DVB con elevada morbilidad y mortalidad, que es causada por cepas NCP del VDVB tipo 2 de alta virulencia que afecta a animales de todas las edades (28,141). Esta presentación se caracteriza por fiebre de 39.4°C a 42°C, agalactia, diarrea acuosa y alteraciones respiratorias, generando la muerte del animal a las 48 horas del inicio de los signos (172). Estos animales presentan una reducción del 50% de los linfocitos circulantes y una marcada trombocitopenia junto a lesiones neumónicas, ulceraciones en la mucosa oral y depleción de los órganos linfoides (159,141). En algunos casos, este proceso evoluciona hacia una forma todavía más grave denominada síndrome hemorrágico (158).

#### **1.4.2.1.4 Síndrome hemorrágico**

El síndrome hemorrágico constituye la forma clínica más grave, causada por cepas NCP del VDVB tipo 2 y con una mortalidad cercana al 25% (30,32,92). Los animales que tienen esta presentación clínica muestran pirexia, diarrea sanguinolenta, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias petequiales y equimosis en mucosas, llegando a producirse sangrado en los sitios de inyección. Además, este síndrome se caracteriza por presentar una marcada trombocitopenia, leucopenia y neutropenia (92,174). Entre las lesiones características destaca una importante depleción de los órganos linfoides, incremento de la apoptosis de linfocitos, vacuolización de células del epitelio basal de la mucosa y vasculitis en diversos órganos (156,158).

#### **1.4.2.2 Bovinos gestantes**

En la infección transplacentaria pueden verse involucrados ambos genotipos del virus, aunque solamente el biotipo NCP puede causar infección persistente (175) cuyas consecuencias se describirán más adelante.

Cuando la infección ocurre con una cepa CP antes de los 60 días de gestación, puede dar lugar a muerte fetal con momificaciones o abortos que se traducen en repeticiones del celo. Estos abortos se producen desde los 10 días post-infección hasta tres meses después (176). Se estima que el VDVB causa alrededor del 6 al 10% de los abortos infecciosos en el ganado (177). Aunque esta infección puede resultar en graves pérdidas reproductivas en algunos rebaños, la forma predominante de infección por VDVB es la infección congénita (178). El feto es altamente susceptible entre los 45 y 125 días de gestación. Los terneros infectados durante este tiempo tienen un alto riesgo de desarrollar anomalías fetales como hipoplasia cerebolosa, atrofia retiniana, cataratas, retraso del crecimiento con desarrollo óseo detenido e hipoplasia pulmonar (177).

De la misma forma las infecciones con cepas CP entre los 100-150 días de gestación, coincidiendo con el comienzo de la inmunocompetencia fetal y la organogénesis, generan malformaciones congénitas, siendo menos frecuentes

los abortos (179). Como se mencionó anteriormente, el VDVB tiene especial tropismo por las células con actividad mitótica activa, destacando las células de tejidos linforreticulares, piel, pulmón, ojos o sistema nervioso central (176), provocando daño celular directo. Así mismo, podemos encontrar malformaciones características como la hipoplasia tímica, hipoplasia y necrosis pulmonar, alopecia, hipotricosis, artrogriposis, retraso en el crecimiento y otras anomalías esqueléticas y oculares, presentando además graves malformaciones a nivel del sistema nervioso como microcefalia, hidrocefalia e hipoplasia cerebolosa (3).

Otra consecuencia de la infección congénita es el nacimiento de terneros seropositivos, que se produce cuando la infección tiene lugar a partir de los 150 días de gestación. Se trata de terneros inmunocompetentes que nacen por lo general sin problemas, aunque presentando anticuerpos específicos contra el VDVB. En algunos casos, se produce el nacimiento de terneros débiles de bajo peso y poco viables, que suelen morir después del nacimiento (180).

#### **1.4.2.2.1 Persistentemente infectados**

Esta condición se presenta cuando una hembra gestante seronegativa se infecta con una cepa NCP del virus entre los 40-125 días de gestación (181), periodo en donde el sistema inmunológico del feto no está maduro y reconoce al virus como propio. Dicho evento, tiene como resultado el nacimiento de animales inmunotolerantes al VDVB, los cuales son incapaces de montar una respuesta inmunológica contra cepas homólogas del virus que causaron la tolerancia inmunológica y se mantendrán como animales que pueden propagar al virus a lo largo de su vida (19). Pueden nacer crías prematuras, de las cuales la mitad muere dentro del primer año de vida; sin embargo, otros pueden desarrollarse sin mostrar signos de enfermedad e incluso llegar a etapa reproductiva, teniendo a su vez crías PI (182).

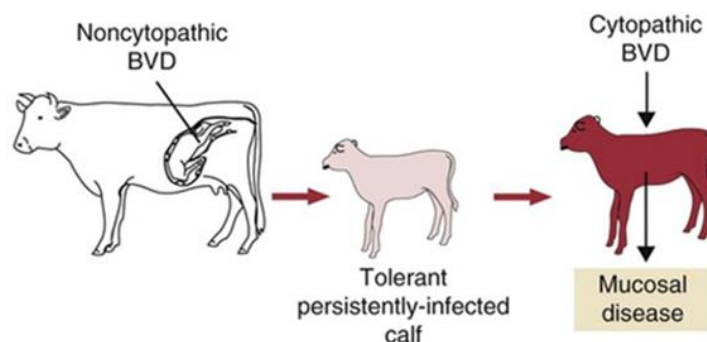
En estos animales existe ausencia de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes (103), pero son inmunocompetentes ya que responden frente a antígenos de virus heterólogos (66,104). La mortalidad de estos animales es superior a la de individuos no infectados, ya que alrededor del 50% mueren en

el primer año de vida (105) debido a sus defectos funcionales en el sistema inmune que inducen un estado de inmunosupresión y a una mayor predisposición frente a infecciones secundarias (95,106).

Debido a lo anterior, los animales PI representan el principal reservorio y fuente de propagación del virus. Aunque estos animales representan del 1%-2% de la población, tienen un gran impacto ya que pueden infectar al 90% de la población en un hato (56).

#### 1.4.2.2.1.1 Enfermedad de las mucosas

La enfermedad de las mucosas (EM) tiene un curso fatal en el 100% de los casos. Ocurre en animales PI que tienen una coinfección con el biotipo CP o por mutación del biotipo NCP al CP (Fig. 7), estos animales desarrollan diarrea severa, erosiones a nivel del tracto gastrointestinal con hemorragias y mueren (183).



**Figura 7.** Esquematación de coinfección en un ternero con una cepa NCP y CP, generando la enfermedad de las mucosas. Tomado de Inmunología Veterinaria, Ian R. Tizard.

### 1.5 CONTAMINACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO POR VDVB

Debido a la capacidad del virus para atravesar la placenta y establecer una infección persistente en el feto inmunológicamente inmaduro, el VDVB es el contaminante más común en el SFB (60). El SFB es un producto que se obtiene a partir de la mezcla de sueros de entre 3500 a 4000 fetos, por lo que se pueden encontrar diferentes cepas en un mismo lote. Como parte del control de calidad del SFB, los lotes son sometidos a procedimientos de inactivación, los cuales no

siempre tienen 100% de efectividad (184). El SFB es ampliamente utilizado como promotor de crecimiento en medios para cultivos celulares; derivado de esto, se ha encontrado una gran variedad de cultivos celulares susceptibles a la infección con el VDVB (185). Debido a que tanto el SFB como los cultivos celulares son utilizados en la producción de vacunas, también es posible encontrar al VDVB como contaminante en productos terminados.

Con anterioridad, se han realizado estudios en donde se ha descrito la presencia del VDVB-1, VDVB-2 (186), y VDVB-3 (44, 174) como contaminante en SFB y vacunas tanto de uso veterinario (60) como de uso en humanos (188), lo que puede tener importantes repercusiones en la salud.

En EUA se realizó una revisión de los reportes de contaminación en SFB donde se encontró que la frecuencia de contaminación tuvo una variación de 20 a 87% del año 1982 a 1990. Adicionalmente, se estudiaron SFB de 1990 a 1997, mostrando un rango que iba de 31.98 a 68.47% de sueros contaminados, dependiendo de la época del año (189).

### **1.5.1 Distribución del SFB contaminado**

Diversos estudios han demostrado la contaminación de SFB por el VDVB (190–192), siendo éste la fuente de infección de líneas celulares y productos biológicos terminados como las vacunas. Estudios realizados en Estados Unidos reportaron que, mediante neutralización viral e inmunoperoxidasa, detectaron en 199 de 1,608 lotes, anticuerpos contra el VDVB. Además, de 190 lotes comercialmente disponibles de SFB lograron aislar al VDVB en 93 de ellos, es decir, del 49% (193). Posteriormente, otro estudio determinó que en años posteriores, de 1990 a 1997, el 60% de los lotes de SFB resultaron positivos al virus o a anticuerpos contra VDVB (189).

De la misma forma, en otro estudio realizado en Polonia se detectó al VDVB mediante RT-PCR en 5 de 12 lotes de SFB (194). En 2004 se identificó por primera vez el virus *HoBi-like* en SFB proveniente de Brasil (35). Posteriormente, en 2015 se estudiaron 26 lotes de SFB de los cuales 15

resultaron positivos al VDVB-3, en donde 7 de ellos eran provenientes de Suramérica y 1 de Australia mientras que del resto se desconocía el origen (52). En 2011, en Suiza se estudiaron 33 lotes de SFB provenientes de varios países, principalmente de Suramérica, donde todos resultaron positivos al VDVB. De los lotes provenientes de Australia se detectaron VDVB-1 y VDVB-3, de Brasil se detectaron VDVB-1, VDVB-2 y VDVB-3. En el caso de USA y México se identificaron los VDVB-1 y VDVB-2; mientras que en Canadá los VDVB-1, VDVB-2 y VDVB-3 fueron detectados. Por otro lado, en Nueva Zelanda se detectó el VDVB-1 como contaminante de SFB, así como en Francia, Dinamarca, República Dominicana y Colombia (187).

Dichas contaminaciones puede repercutir en una mala interpretación de los datos obtenidos durante investigaciones o de los resultados obtenidos en técnicas diagnósticas cuya metodología incluye el uso de cultivos celulares (62). Ejemplo de ello se observó en un ensayo con niveles bajos de replicación del virus de Hepatitis C, asociado a la presencia de VDVB como contaminante del SFB, alterando el ciclo replicativo del virus de Hepatitis C (195).

### **1.5.2 Impacto de la Contaminación de SFB en líneas celulares y vacunas**

El uso de SFB contaminado con el VDVB, deriva en la contaminación subsecuente de cultivos y líneas celulares susceptibles en donde es utilizado. En Estados Unidos se ha documentado la contaminación por el VDVB de 13 líneas celulares procedentes de bovinos, ovinos, caprinos, ciervos, bisontes, cerdos, conejos, hámsteres, gatos, perros, mono, humano y mosquito, obtenidas de la *American Type Culture Collection*, (ATCC por sus siglas en inglés) evidenciado mediante inmunoperoxidasa y RT-PCR (185). Así mismo, otro estudio reveló la contaminación con el VDVB activo en 5 de 39 líneas celulares de fibroblastos fetales de origen bovino que eran utilizadas para ensayos de clonación, mediante la técnica de RT-PCR, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia (196).

Las consecuencias de dichas infecciones pueden tener una repercusión en la investigación y producción de productos biológicos. Así mismo, la coinfección con el VDVB puede incrementar la severidad de los signos de otras enfermedades en animales. En un estudio realizado por Woods *et al.*, se demostró que el VDVB detectado como contaminante de cultivo celular en donde realizaban la atenuación del virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo (VGTC), era capaz de producir signos clínicos en lechones similares a los causados por el VGTC. Sin embargo, se demostró que la coinfección con ambos aumentaba la severidad de los signos de enfermedad (62).

De la misma forma, se ha demostrado que el VDVB puede infectar células de animales no ungulados. Un estudio realizado en EUA, mostró que células derivadas de conejo, hámster, primates no humanos y fibroblastos de embrión de pollo pueden infectarse con VDVB, mediante el uso de materias primas contaminadas durante la fabricación (197).

Como se ha mencionado, el VDVB se ha detectado en vacunas, tanto de uso humano (185,186) como de uso veterinario, teniendo serias implicaciones en la generación de brotes de la enfermedad. En 1999 en Italia, se reportó y reprodujo un brote de la DVB mediante la inmunización de bovinos con vacunas de virus activo contra rinotraqueitis bovina (IBR) contaminadas con VDVB (59). Ese mismo año se reportaron brotes de DVB en 12 granjas Holandesas, en donde todos los animales de 11 de las 12 granjas fueron sometidos a eutanasia después de identificar que la fuente de infección fue un lote de vacunas contra herpesvirus bovino tipo 1 contaminada con el VDVB. Este fue el tercer reporte de DVB en bovinos después de la administración de una vacuna contaminada en los Países Bajos (200). En vacunas de uso humano también se ha encontrado evidencia de la presencia de material genético de VDVB, aunque no se demostró su capacidad infectiva (201).

## **2 JUSTIFICACIÓN**

El SFB es ampliamente utilizado como un factor de crecimiento en cultivos celulares que son empleados en la investigación, diagnóstico y en la producción y control de calidad de vacunas virales. Debido a la capacidad que tiene el VDVB de cruzar la barrera placentaria y establecer una infección persistente en el feto, es común encontrarlo como uno de los principales contaminantes de SFB que se comercializa mundialmente; por lo tanto, es necesario asegurar la pureza de dicho producto biológico al descartar la presencia del VDVB como contaminante en SFB comerciales, mediante de técnicas moleculares y determinar su actividad biológica en cultivo celular. Lo anterior, permitirá utilizar SFB de forma segura en los procesos antes descritos.

### **3 HIPÓTESIS**

Debido a su capacidad de cruzar barrera placentaria, el VDVB puede ser detectado como contaminante en el SFB por medio de técnicas moleculares, por lo tanto se podrá demostrar su actividad biológica en cultivo celular.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Realizar la detección y aislamiento del VDVB contaminante a partir de muestras de SFB comerciales mediante técnicas moleculares, biológicas e inmunológicas para comprobar su actividad biológica.

## **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la prevalencia del VDVB en muestras de SFB mediante RT-PCR.
2. Obtener las secuencias nucleotídicas de la región 5' UTR de cada una de las muestras positivas al VDVB mediante secuenciación.
3. Realizar la caracterización genética de los subgenotipos de los VDVB contaminantes detectados en las muestras de SFB.
4. Demostrar la actividad biológica de los VDVB detectados en las muestras de SFB positivas por RT-PCR, mediante el uso de técnicas de cultivo celular con células MDBK e inmunoperoxidasa.

## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 MUESTRAS

Se procesaron 16 muestras de SFB proveniente de diferentes laboratorios productores de vacunas veterinarias y lotes comercializados en México.

### 5.2 EXTRACCIÓN DE ARN

Se realizó la extracción de ARN total de las 16 muestras de SFB, así como de la cepa NADL (VDVB cepa NADL ATCC VR-1422) y células MDBK utilizadas control positivo y control negativo respectivamente. La extracción de ARN se realizó con base en el protocolo del producto comercial Trizol® Reagent<sup>1</sup> (Molecular Research Center Inc.). Brevemente, se utilizaron 400 µl de cada muestra, y se adicionaron 900 µl de Trizol® Reagent, se mezclaron en agitador<sup>2</sup> por 15 segundos y se incubaron durante 5 min en hielo; posteriormente se agregaron 240 µl de cloroformo a cada muestra y nuevamente se mezclaron en el agitador por 15 segundos para después realizar una incubación en hielo durante 10 min. Se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4°C<sup>3</sup>, se tomó el sobrenadante de cada muestra y se colocaron en tubos con 600 µl de isopropanol, los cuales se homogenizaron cuidadosamente para posteriormente dejar en incubación durante 1 hora a -20°C. Después de este paso, se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4°C y se decantó el sobrenadante de cada tubo, se adicionó 1ml de etanol al 75% y nuevamente se centrifugaron a 14000 rpm por 15 min a 4°C. Finalmente, se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente dentro de la campana de flujo laminar. Pasado el tiempo necesario, se resuspendió cada pastilla de ARN en 20µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), homogenizando cuidadosamente. El ARN total obtenido de cada muestra fue cuantificado por medio de espectrofotometría<sup>4</sup> y almacenado a -71°C hasta su uso.

---

<sup>1</sup> Invitrogen

<sup>2</sup> Vortex

<sup>3</sup> Ependorf AG modelo 5804R

<sup>4</sup> Nanodrop Spectrophotometer ND1000

### 5.3 TRANSCRIPTASA REVERSA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

Para la detección del VDVB se utilizó la técnica de RT-PCR para amplificar un fragmento de la región 5' UTR, utilizando los iniciadores descritos a continuación en el cuadro 3. Los reactivos y concentraciones empleados en la técnica, se detallan en los cuadros 4 y 5.

| Iniciador         | Sentido | Secuencia                | Tamaño del producto | Autor                           |
|-------------------|---------|--------------------------|---------------------|---------------------------------|
| VIL 324/326       | Forward | ATGCCCATAGTAGGACTAGCA    | 288 pb              | Vilcek ( <i>et al.</i> , 1994)  |
|                   | Reverse | TCAACTCCATGTGCCATGTAC    |                     |                                 |
| HCV 90/368        | Forward | CCATGTGCCATGTACAG        | 278 pb              | Ridpath ( <i>et al.</i> , 1994) |
|                   | Reverse | CATGCCCATAGTAGGAC        |                     |                                 |
| 5UTR/START Mahony | Forward | CTAGCCATGCCCTTAGTAGGACTA | 292 pb              | Mahony ( <i>et al.</i> , 2005)  |
|                   | Reverse | CAACTCCATGTGCCATGTACAGCA |                     |                                 |

**Cuadro 3.** Iniciadores utilizados para la RT-PCR.

| Reactivo              | Concentración inicial | Concentración final |
|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| Buffer                | 5x                    | 0.02x               |
| Inhibidor de RNAsas   | 40 U/μl               | 20 U                |
| dNTP's                | 200 U/μl              | 400 U               |
| Iniciador antisentido | 20 μM                 | 0.4 μM              |
| Transcriptasa Reversa | 200 U/μl              | 200 U/reacción      |
| ARN Total             | Varía por muestra     | 500 ng/μl           |
| Agua                  |                       | c.b.p. 20 μl        |
| Volumen final         |                       | 20 μl               |

**Cuadro 4.** Reactivos y concentraciones utilizadas para la RT.

| Reactivo              | Concentración inicial | Concentración final |
|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| Buffer                | 10X                   | 1X                  |
| MgCL2                 | 50 mM                 | 1.5 mM              |
| Iniciador sentido     | 20 $\mu$ M            | 0.4 $\mu$ M         |
| Iniciador antisentido | 20 $\mu$ M            | 0.4 $\mu$ M         |
| Taq Polimerasa        | 5U/ $\mu$ L           | (25 $\mu$ L)        |
| cDNA                  |                       | 5 $\mu$ L           |
| Agua                  |                       | c.b.p. 25 $\mu$ L   |
| Volumen final         |                       | 25 $\mu$ L          |

**Cuadro 5.** Reactivos y concentraciones utilizadas para la PCR.

Una vez realizadas las mezclas de reacción para la PCR, fueron sometidas al termociclador<sup>5</sup> bajo las siguientes condiciones, descritas en el cuadro 6.

| VIL 324/326              | HCV 90/368    | 5'UTR START   |
|--------------------------|---------------|---------------|
| <b>Desnaturalización</b> |               |               |
| 56°C – 1 hora            | 56°C – 1 hora | 56°C – 1 hora |
| 94°C – 2 min             | 94°C – 4 min  | 94°C – 4 min  |
| <b>Alineamiento</b>      |               |               |
| 94°C – 30 s              | 94°C – 10 s   | 94°C – 30 s   |
| 55°C – 30 s              | 55°C – 15 s   | 56.2°C – 30 s |
| 72°C – 30 s              | 72°C – 45 s   | 72°C – 30 s   |
| 38 ciclos                | 40 ciclos     | 35 ciclos     |
| <b>Extensión</b>         |               |               |
| 72°C – 7 min             | 72°C – 10 min | 72°C – 10 min |

**Cuadro 6.** Condiciones utilizadas en el termociclador para cada par de iniciadores.

<sup>5</sup> Techne, techgene®, Inglaterra

Los productos obtenidos de la RT-PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x teñido con GelRed Nucleid Acid®<sup>6</sup> para la interpretación de los resultados.

## 5.4 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los productos de la PCR obtenidos de cada muestra utilizando los iniciadores VIL 324/326, HCV 90/368 y 5'UTR START (Cuadro 3) fueron purificados utilizando el kit QIAquick Gel Extraction®<sup>7</sup> bajo las indicaciones del fabricante y se enviaron al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM, para ser secuenciados. Cada producto de PCR, se secuenció en ambos sentidos utilizando un secuenciador automático de DNA de 16 capilares<sup>8</sup>.

Una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos, fueron comparadas con secuencias de referencia previamente reportadas en la base de datos del *GenBank*. Para su alineamiento se utilizó el programa ClustalW (202), usando el software BioEdit (203). El análisis filogenético se realizó con la paquetería del programa MEGA versión 7 (204) con los siguientes parámetros: con base en el criterio de información bayesiana, se usó el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2 parámetros con una distribución Gamma discreta (+G) (205) y el método de máxima verosimilitud para la reconstrucción filogenética (206) con 1000 repeticiones de *bootstraps* como método de soporte estadístico (207) .

## 5.5 AISLAMIENTO DEL VDVB

Las muestras se trabajaron por duplicado en placas de cultivo de 24 pozos, añadiendo aproximadamente  $2.5 \times 10^3$  células *Madin-Derby Bovine Kidney* (MDBK) (208) en 1 ml de medio de cultivo celular DMEM, enriquecido con 5% de suero equino y 5% de caldo trifosfato (TPB). Se agregaron 400 µl de cada muestra por pozo, así como del control (+) y (-), correspondiente a la cepa NADL y dos cepas NCP del VDVB. Las placas fueron incubadas por 5 días a 37°C con

---

<sup>6</sup> Biotum

<sup>7</sup> Qiagen

<sup>8</sup> Applied Biosystems, modelo 3130xl

5% de CO<sub>2</sub>. Se realizaron 4 pases ciegos, el último en placas de 6 pozos. Cada 24 horas durante 7 días de incubación post-infección, los pozos fueron observados al microscopio para observar efecto citopático. Una vez transcurrido este tiempo, las placas fueron sometidas a -70°C para provocar la ruptura de las células y con ello, la liberación de los viriones; se descongelaron y el contenido de cada pozo, fue centrifugado para obtener el sobrenadante. La detección de la actividad biológica de los virus aislados fue evidenciada mediante la técnica de inmunohistoquímica.

## 5.6 INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

La inmunohistoquímica (IHQ) se realizó en células MDBK cultivadas en placas de 96 pozos; para su fijación a la placa se tomó como base el método descrito por Suthipintawong *et al* (209). Brevemente, cuando las células alcanzaron un 60% de confluencia, fueron infectadas e incubadas durante 96 horas con 50 µl de las cepas utilizadas como controles positivos, mismas que fueron utilizadas en el aislamiento viral, mientras que células sin infectar fueron asignadas como controles negativos. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS y se fijaron las células con acetona-metanol (1:1) durante 10 min, se decantó y se dejó secar la placa para almacenarla a 4°C hasta su uso. En adelante, las condiciones estandarizadas durante éste trabajo para realizar la IHQ, se basaron en las sugeridas por el fabricante del kit utilizado, como se describe a continuación.

Se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena en cada pozo con una solución 1:8 de peróxido de hidrógeno-metanol durante 10 min y a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado de 5 min con PBS y se aplicó el primer reactivo del kit *MACH 1 Universal HRP-Polymer Detection*<sup>9</sup>; el *Background Sniper*, que se incubó durante 7 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó otro lavado con PBS de 5 minutos y se agregó el anticuerpo primario monoclonal 3.12F1<sup>10</sup> - dirigido contra la proteína E2- en una dilución 1:2000 en PBS. Pasado el tiempo de incubación de 1 hora a 37°C, se

---

<sup>9</sup> BIOCARE Medical

<sup>10</sup> Vmrdr Veterinary Medical Research & Development

lavó con PBS y se continuó con la aplicación de los siguientes reactivos del kit, ahora el *MACH 1 Mouse Probe*, para después incubar durante 20 min a temperatura ambiente. Posterior a un lavado con PBS de 5 min, se agregó el reactivo *HRP-Polymer* e incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Se realizó otro lavado de 5 min con PBS y se preparó la diaminobencidina (DAB) colocando a 1 ml del reactivo *DAB Sustrato buffer* y 1 gota de *DAB Chromogen*, se aplicó a todos los pozos de la placa y se detuvo la reacción al minuto de incubación aplicando agua destilada.

Para la contratinción, se aplicaron 30 µl de hematoxilina a cada pozo durante 1 min y se realizó un lavado con agua destilada, se agregaron 30 µl de agua amoniacal dejando actuar por 1 min; posteriormente, se realizó otro lavado de 5 min con agua destilada y se colocaron 30 µl de alcohol al 70% se decantó y se agregaron 30 µl de alcohol al 80%, después de decantar se agregaron 30 µl de alcohol al 96% y finalmente, 30 µl de alcohol absoluto luego de decantar. Todos los alcoholes se dejaron actuar por 1 min.

### **5.6.1 Muestras para la IHQ**

Se cultivaron en una placa de 96 pozos células MDBK, cuando éstas alcanzaron un 60% de confluencia se colocaron 50 µl de sobrenadante del último pase de cada una de las muestras, así como de la cepa NADL y las 2 cepas NCP como controles positivos. Células sin infectar fueron utilizadas como controles negativos. La placa se incubó durante 96 horas y transcurrido este tiempo fue fijada con metanol-acetona en una proporción 1:1 durante 10 min y almacenada a -71°C hasta su uso.

La IHQ se realizó bajo las condiciones antes descritas, hasta la contratinción de las células.

## 6 RESULTADOS

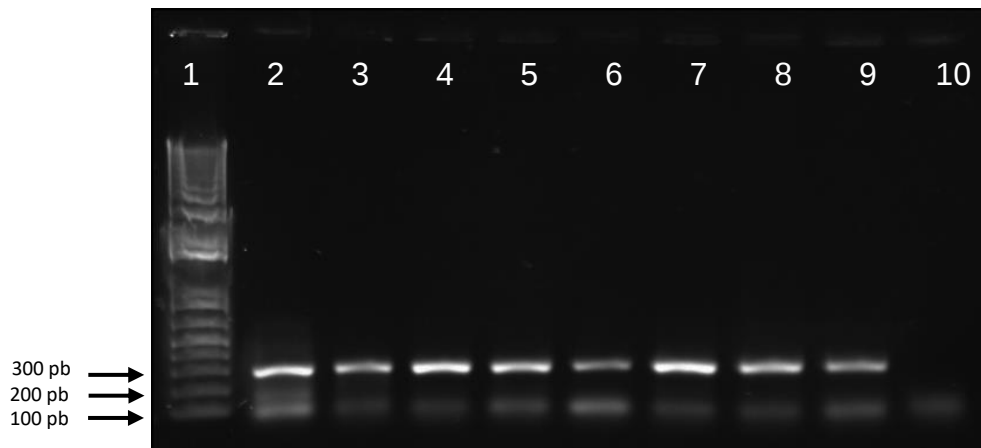
### 6.1 AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE LA REGIÓN 5'UTR

Los resultados obtenidos de la RT-PCR utilizando los juego de iniciadores descritos en la sección de metodología, se muestran en el siguiente cuadro.

| Muestra          | Iniciadores  |            |             |
|------------------|--------------|------------|-------------|
|                  | 5' UTR START | HCV 90/368 | VIL 324/326 |
| SFB 1            | +            | +          | +           |
| SFB 2            | +            | +          | +           |
| SFB 3            | +            | +          | +           |
| SFB 4            | +            | +          | -           |
| SFB 5            | +            | +          | +           |
| SFB 6            | +            | +          | +           |
| SFB 7            | +            | +          | +           |
| SFB 8            | +            | +          | +           |
| SFB 9            | +            | +          | +           |
| SFB 10           | +            | +          | -           |
| SFB 11           | +            | +          | +           |
| SFB 12           | +            | +          | +           |
| SFB 13           | +            | +          | +           |
| SFB 14           | +            | +          | -           |
| SFB 15           | +            | +          | +           |
| SFB 16           | +            | +          | +           |
| Total de SFB (+) | 16           | 16         | 13          |
| % de SFB (+)     | 100%         | 100%       | 81.25%      |

**Cuadro 7.** Resultados de la RT-PCR, utilizando los 3 pares de iniciadores con cada una de las muestras de SFB.

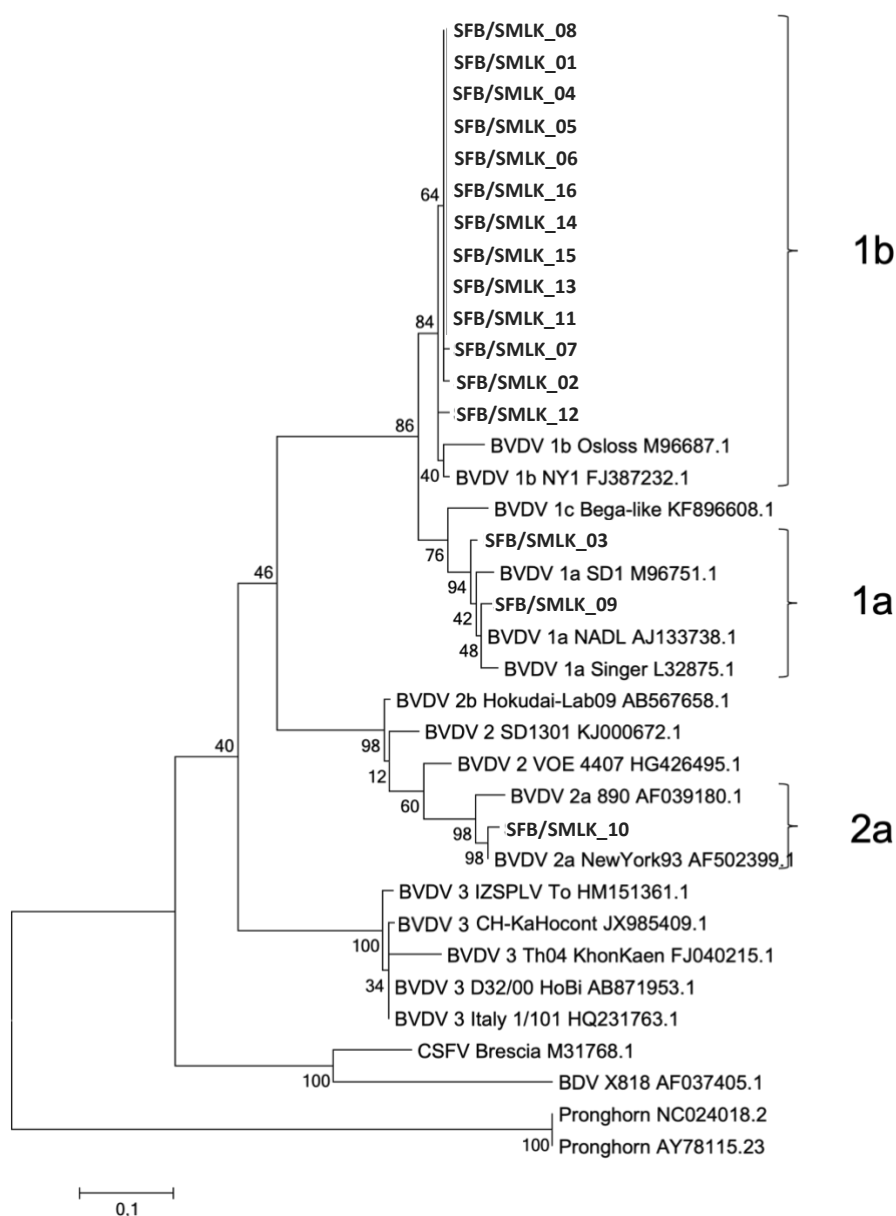
En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos de la electroforesis realizada con los iniciadores 5'UTR START.



**Figura 8. Producto de la RT-PCR con los iniciadores 5'UTR START.** Fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con GelRed® en TAE 1x. Carril 1: MTM 1 Kb Plus, carril 2: NADL como control positivo, carril 3: SFB-3, carril 4: SFB-8, carril 5: SFB-11, carril 6: SFB-9, carril 7: SFB-5, carril 8: SFB-10, carril 9: SFB-6, carril 10: control negativo.

## 6.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se realizó el análisis filogenético del fragmento de la región 5'UTR secuenciado de cada una de las muestras positivas y de las secuencias de referencia obtenidas del *GenBank* utilizando el software Mega 7. Como método de soporte estadístico, se utilizaron 1000 bootstraps; obteniendo el siguiente árbol filogenético (Fig. 9). Las secuencias obtenidas en este trabajo se depositaron en el *GenBank* y se identificaron con números de acceso del OQ411605 al OQ411620.

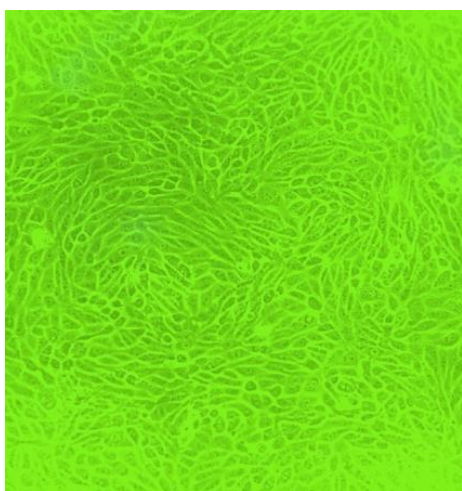


**Figura 9. Árbol filogenético basado en la región 5'UTR del VDVB.** El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud utilizando un fragmento de 290 nucleótidos contenido en la región 5'UTR. Se utilizaron las secuencias obtenidas en este trabajo (negritas) y las secuencias de cepas de referencia obtenidas del GenBank. El número de acceso de las secuencias de referencias está indicado a un costado del nombre de la cepa. Los números sobre los nodos representan el valor de bootstraps.

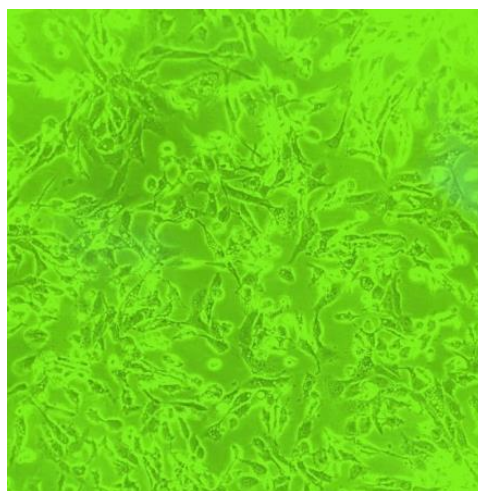
Los productos de la RT-PCR analizados se segregaron en 3 clados correspondientes a los subgenotipos 1a, 1b y 2a; obteniendo 2 muestras positivas para 1a, 13 para 1b y 1 para 2a. Cabe destacar que el patrón de resultados obtenido es similar a los subgenotipos de VDVB que circulan en las poblaciones de ganado bovino de América del Norte y México.

### 6.3 AISLAMIENTO VIRAL

Las células MDBK no infectadas y utilizadas como controles negativos no presentaron efecto citopático (Fig. 10), mientras que las células infectadas con la cepa NADL utilizadas como controles positivos presentaron efecto citopático a las 48 horas postinfección (Fig. 11). De las 16 muestras analizadas se obtuvieron 13 muestras positivas y 3 negativas, lo que representa el 81.25% y 18.75% respectivamente, cuyo resumen se muestra en el cuadro 8. Estos resultados fueron evidenciados por medio de inmunohistoquímica, como se muestra más adelante.



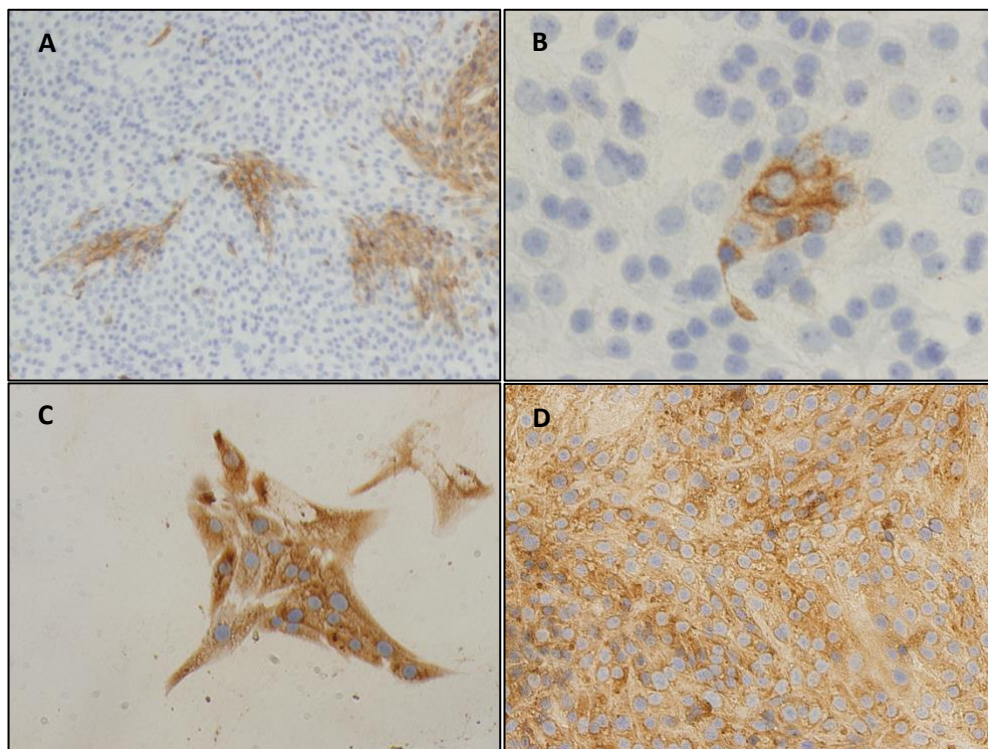
**Figura 10.** Fotografía 40x de cultivo celular MDBK sin infectar, utilizado como control (-).



**Figura 11.** Fotografía 40x de cultivo celular MDBK infectado con la cepa NADL, utilizado como control (+).

#### 6.3.1 Inmunohistoquímica (IHQ)

En esta prueba se utilizó la cepa NADL y dos cepas NCP como controles positivos, el control negativo corresponde a células MDBK sin infectar. Después de aplicar el protocolo establecido en los ensayos de estandarización, se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 12, donde las marcas positivas se observan de color marrón.

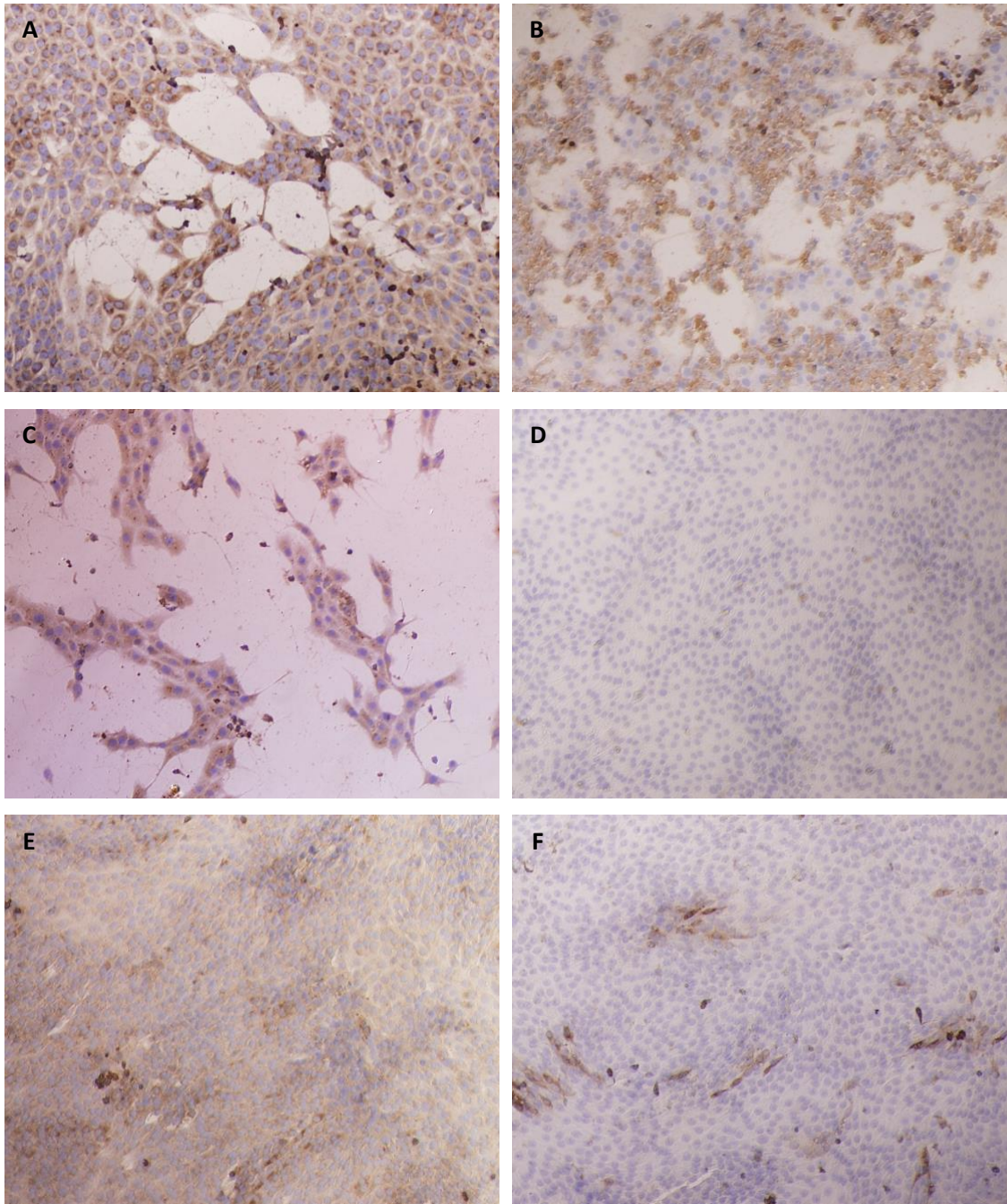


**Figura 12.** Fotografías de cultivos de células MDBK infectadas con cepas de referencia utilizados como controles positivos durante la estandarización de la IHQ. Las marcas positivas se observan de color marrón en el citoplasma y alrededor del núcleo celular. **A)** Fotografía 4X de cultivo celular infectado con una cepa NCP. **B)** Fotografía 100x de cultivo celular inoculado con una cepa CP. **C)** Fotografía 40X de cultivo celular infectado con una cepa CP correspondiente a NADL. **D)** Fotografía 4X de cultivo celular infectado con una cepa NCP.

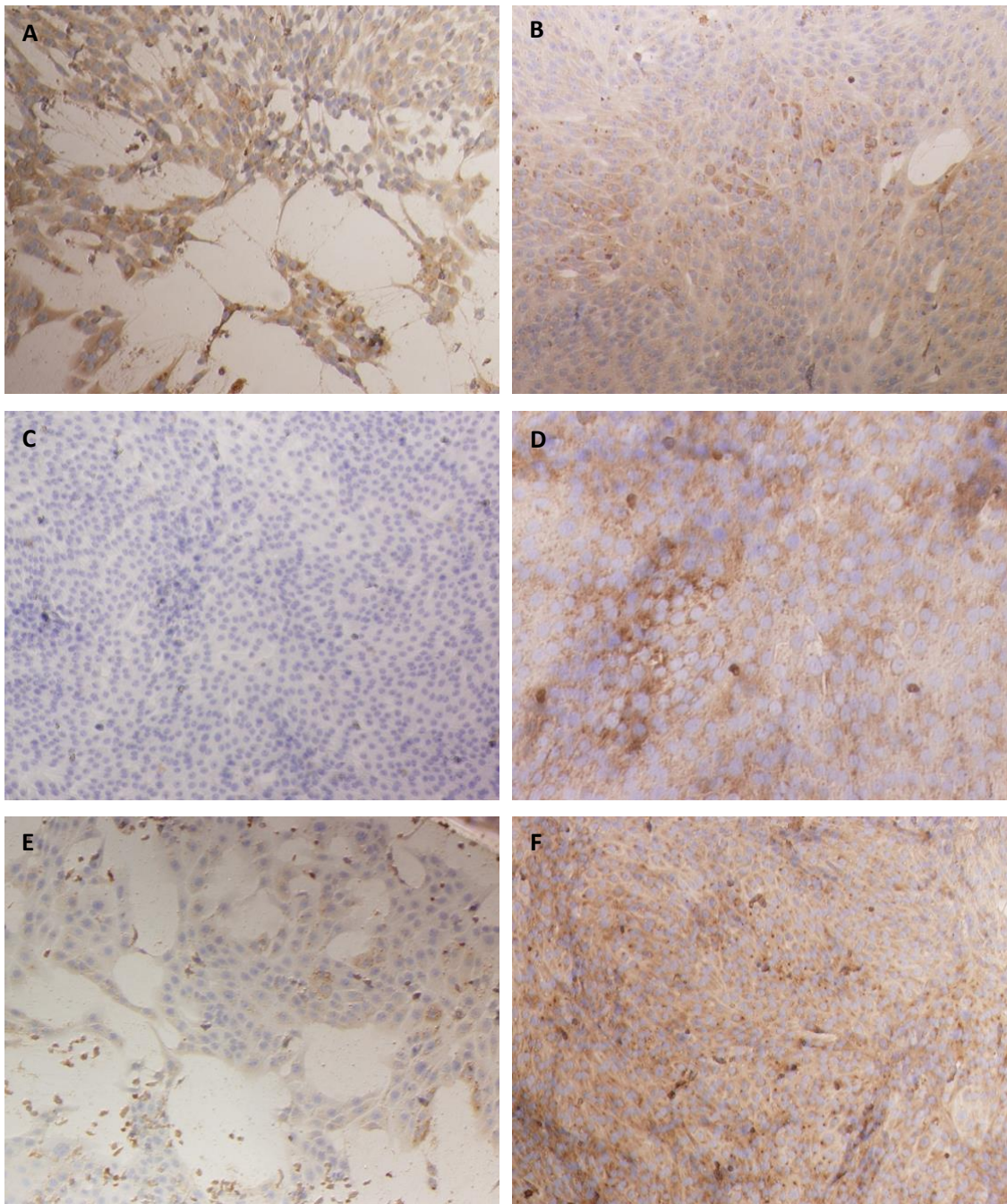
### 6.3.2 Muestras para la IHQ

Al evaluar la actividad biológica del VDVB detectado en las 16 muestras de SFB por medio de IHQ, se obtuvieron los siguientes resultados:

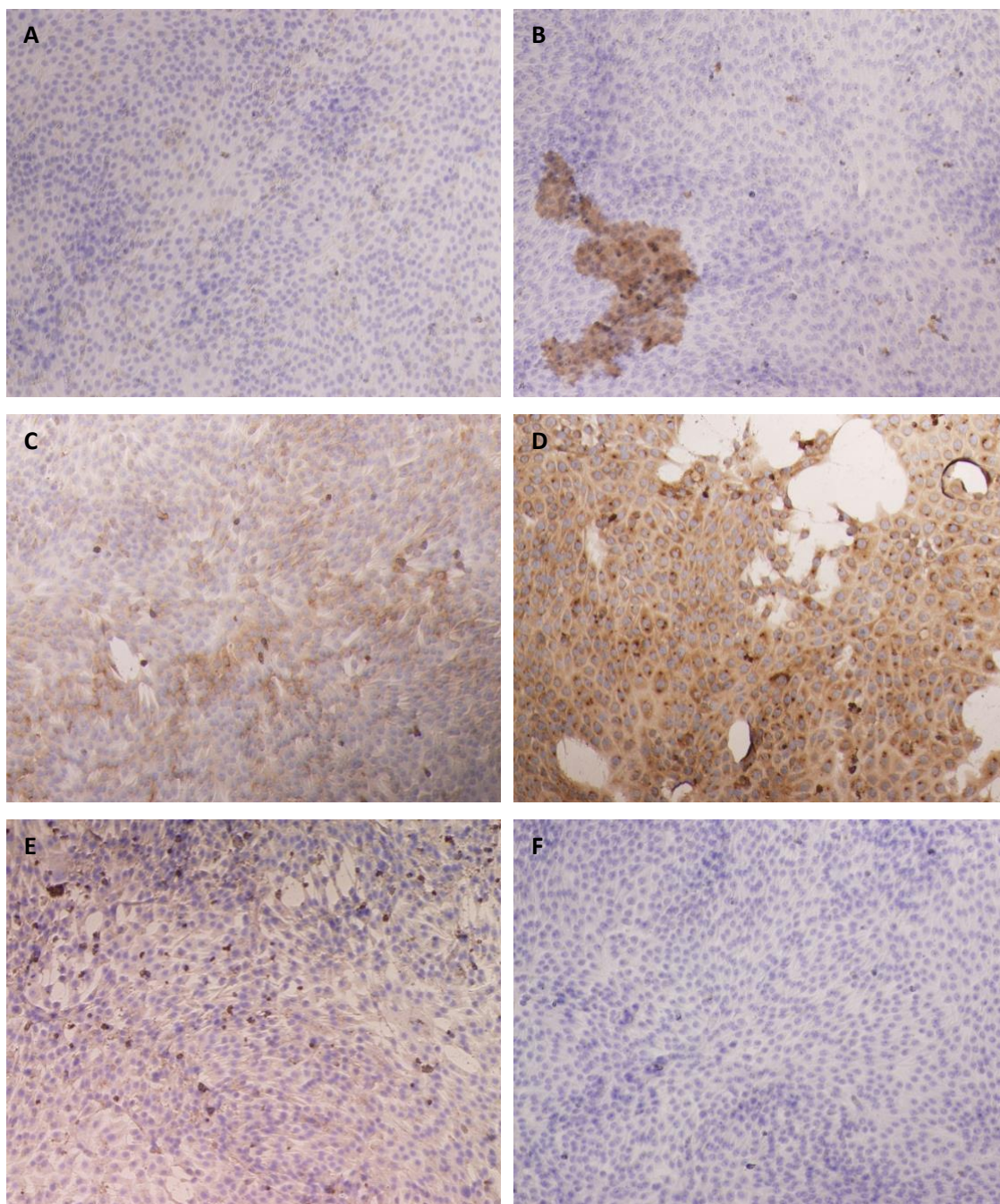
- 13 muestras positivas; SFB 1, SFB 2, SFB 4, SFB 5, SFB 6, SFB 7, SFB 8, SFB 9, SFB 10, SFB 11, SFB 14, SFB 15 y SFB 16 (Fig. 13, 14 y 15).
- 3 muestras negativas; SFB 3, SFB 12 y SFB 13 (Fig. 13, y 15).



**Figura 13. Resultados de la IHQ realizada en cultivo celular.** **A)** Fotografía 10x de células MDBK infectadas con la cepa NADL como control (+). **B)** Fotografía 10x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 1. **C)** Fotografía 10x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 2. **D)** Fotografía 4x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 3. **E)** Fotografía 4x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 4. **F)** Fotografía 4x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 5.



**Figura 14. Resultados de la IHQ realizada en cultivo celular. A)** Fotografía 4x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 6. **B)** Fotografía 4x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 7. **C)** Fotografía 4x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 8. **D)** Fotografía 10x de células inoculadas con la muestra SFB 9. **E)** Fotografía 4x de cultivo células inoculadas con la muestra SFB 10. **F)** Fotografía 4x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 11.



**Figura 15. Resultados de la IHQ realizada en cultivo celular.** **A)** Fotografía 4x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 12. **B)** Fotografía 4x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 13. **C)** Fotografía 4x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 14. **D)** Fotografía 10x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 15. **E)** Fotografía 4x de células MDBK inoculadas con la muestra SFB 16. **F)** Fotografía 4x de células MDBK sin inocular, como control (-).

En el cuadro 8 se muestra el resumen de los resultados obtenidos de la RT-PRC, el genotipo detectado en cada aislamiento viral y de la IHQ.

| <b>Muestra</b> | <b>RT-PCR Inicial</b> | <b>Genotipo detectado</b> | <b>IHQ</b> |
|----------------|-----------------------|---------------------------|------------|
| SFB 1          | +                     | 1b                        | +          |
| SFB 2          | +                     | 1b                        | +          |
| SFB 3          | +                     | 1a                        | -          |
| SFB 4          | +                     | 1b                        | +          |
| SFB 5          | +                     | 1b                        | +          |
| SFB 6          | +                     | 1b                        | +          |
| SFB 7          | +                     | 1b                        | +          |
| SFB 8          | +                     | 1b                        | +          |
| SFB 9          | +                     | 1a                        | +          |
| SFB 10         | +                     | 2a                        | +          |
| SFB 11         | +                     | 1b                        | +          |
| SFB 12         | +                     | 1b                        | -          |
| SFB 13         | +                     | 1b                        | -          |
| SFB 14         | +                     | 1b                        | +          |
| SFB 15         | +                     | 1b                        | +          |
| SFB 16         | +                     | 1b                        | +          |

**Cuadro 8.** Resumen de resultados de la RT-PCR inicial, los genotipos aislados y de la IHQ.

## 7 DISCUSIÓN

Se evaluaron 16 muestras de SFB comercializado en México para la detección de genoma del VDVB mediante la técnica de RT-PCR, utilizando iniciadores previamente reportados para amplificar la región 5'UTR del genoma del VDVB. El 100% de las muestras resultaron positivas al VDVB por RT-PCR, revelando la presencia del RNA viral contaminante. Similar a estudios previos realizados en EUA en donde se ha demostrado la contaminación de SFB con el VDVB en una frecuencia que va del 20% al 87 % (189), mientras que en Japón fue del 57.1% de un total de 49 muestras procedentes de distintas partes del mundo donde además lograron el aislamiento de dos agentes virales correspondientes al genotipo 1 del VDVB (210) y en Suiza, de un estudio realizado en 33 muestras originarios de diferentes países, el 100% resultaron positivas al virus (187).

La mayoría de los procesos de fabricación de productos biológicos involucran el uso de medios de cultivo que se suplementan con SFB (211), debido a la alta frecuencia del VDVB como contaminante, el uso de SFB implica la subsecuente contaminación de cultivos celulares, vacunas y virus semilla tratados con el SFB contaminado (59,62,185,196–201,212). Además se ha visto que puede interferir tanto en investigaciones como en la evaluación de vacunas (62), o generar interpretaciones erróneas de pruebas diagnósticas. Por ejemplo, el uso de vacunas contaminadas con VDVB en cerdos, puede inducir la producción de anticuerpos que podrían interferir con los programas de vigilancia serológica del VFPC (213). Aunado a lo anterior, se ha reportado que el uso de vacunas contaminadas con VDVB puede producir brotes de la enfermedad en bovinos (59) y cerdos (214) como se mencionó previamente.

Para obtener más información acerca de los subgenotipos presentes en las muestras, se realizó el análisis filogenético de la región amplificada. Los resultados mostraron que de las 16 secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de las muestras de suero, 13 se agruparon en los subgenotipos correspondientes al 1b, 2 en el clado de 1a, y solamente 1 en el subgenotipo 2a. Estos resultados son similares a los descritos previamente en ganado bovino y fauna silvestre de México; en estudios realizados por Gómez Romero *et al* se detectaron como

subgenotipos predominantes al 1a, 1b, 1c y 2a en bovinos de 6 regiones de Méxicio (141); posteriormente en un estudio llevado a cabo por Medina Gudiño *et al* se detectó y aisló al subgenotipo 1b a partir de un venado gamo (*Dama dama*) de México (142). Al mismo tiempo, los subgenotipos 1a y 1b se han reportado como los predominantes en poblaciones ganaderas en EUA (186) y Canadá (27) mientras que el 2a se ha descrito como endémico de EUA (215) pero, al igual que en éste estudio, con una menor frecuencia (216).

La diseminación de los diversos subgenotipos del VDVB esta influenciada por factores como la localización geográfica de poblaciones ganaderas, el desplazamiento de rumiantes silvestres, y el estrecho contacto que puede haber entre ellos. Lo anterior, debido a que el ganado bovino pueda valer como reservorio y potencial fuente de infección para animales silvestres (217) y viceversa, es decir, también existe un riesgo de que los animales silvestres como el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), introduzcan la infección por VDVB al ganado (218). Aunado a los factores antes mencionados, existen otros relacionados más estrechamente con la intervención humana como la movilización y compra de ganado (55), prácticas comunes en hatos como el manejo reproductivo mediante inseminación artificial (164) y transferencia de embriones (58), palpación rectal (166) o el uso de materiales contaminados con secreciones de animales portadores del virus (29) y otras iatrogenias como las inmunizaciones con vacunas contaminadas (59,200). El uso de productos biológicos terminados contaminados puede desencadenar brotes de la DVB como se ha observado en otros países como Italia, donde se produjo un brote de la enfermedad por vacunación en ganado bovino inmunizando contra IBR (185), o produciendo signos de enfermedad en otras especies como sucedió en cerdos vacunados contra gastroenteritis transmisible del cerdo (TGC), los cuales desarrollaron signos respiratorios y digestivos (214).

Durante este estudio, se comprobó mediante RT-PCR que las células utilizadas en el aislamiento viral estuvieran libres del VDVB evitando así sesgos en los resultados, pues se sabe que algunas líneas celulares provenientes de laboratorios proveedores de material biológico tuvieron resultados positivos a

infecciones por este virus (185). Aunado a este control, todos los cultivos celulares fueron suplementados con suero equino (SE).

Se realizó la técnica de inmunoperoxidasa para poder detectar antígenos del VDVb NCP en los cultivos celulares, ya que antes del tercer pase, no se había observado vacuolización ni muerte celular de las monocapas infectadas. Es una práctica común de diagnóstico de VDVb realizar inmunohistoquímica de cortes de tejido (219); sin embargo, esta técnica se adaptó para realizar la detección del virus directamente en cultivo celular, teniendo resultados muy concretos, donde 13 de las 16 muestras, resultaron positivas a la detección del VDVb; SFB 1, SFB 2, SFB 4, SFB 5, SFB 6, SFB 7, SFB 8, SFB 9, SFB 10, SFB 11, SFB 14, SFB 15 y SFB 16. Mientras que las muestras SFB 3, SFB 13 y SFB 12, resultaron negativas. Es decir, el 81.25% de las muestras contenían no sólo el genoma viral, si no partículas virales con la capacidad de replicarse en cultivo celular. Estos resultados respaldan hallazgos de estudios anteriores, en los cuales fue posible aislar o detectar virus activo en muestras de SFB. Lo anterior, refuerza el evidente riesgo de causar brotes de la DVB por iatrogenia; por lo tanto, se reitera la necesidad de llevar a cabo medidas de control de calidad en el manejo de productos biológicos, como el SFB, a pesar de ser sometidos a procesos de inactivación ya que no siempre son 100% eficientes (184).

Se corroboró la actividad biológica de los virus detectados aún en sueros sometidos a un proceso de inactivación por calor, evidenciando que el tratamiento en baño María a 56° C durante 30 min, no es un método eficaz para inactivar al VDVb, ya que en 13 de 16 muestras se logró el aislamiento del virus; similar a los hallazgos reportados por Tuncer y Yesilbag en Turquía en 2016, en el cual en 4 de 14 muestras sometidas a las mismas condiciones, mantuvieron al VDVb activo, logrando su aislamiento e identificación mediante la inmunoperoxidasa (220). Así mismo, la OIE publicó que dicho método, es inadecuado para la inactivación del VDVb (150).

Finalmente, se relacionaron los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas aplicadas en este trabajo (cuadro 8); 13 de los 16 sueros que resultaron positivos al VDVb mediante RT-PCR, también lo fueron en la

inmunohistoquímica y en 5 de los 13 aislamientos, se observó el efecto CP del virus en los cultivos infectados en el cuarto pase ciego, lo que demuestra la capacidad del virus de replicarse cultivo celular.

Estos hallazgos enfatizan la presencia del virus en el SFB, similar a publicaciones previas realizadas en EU (172,44), Polonia (194), Brasil (35), y Suiza (187) entre otros estudios de prevalencia del virus en SFB; sin embargo, en México son pocos los estudios que se han llevado a cabo y aunque gracias ellos se sabe un poco más acerca de los genotipos y subgenotipos presentes tanto en SFB (221) como en algunos animales silvestres susceptibles (142) y ganado bovino (141), no se cuenta con suficiente información para precisar la distribución del virus y sus cepas. También, se requiere más información sobre su incidencia, prevalencia e impacto económico, así como del papel que juega dicha contaminación en la diseminación, mantenimiento y generación de nuevas variantes del virus. Este y otros estudios resaltan la alta frecuencia de contaminación como consecuencia de un deficiente control de calidad de los productos biológicos, por lo que se propone el uso métodos eficientes que permitan la detección del virus y la prevención de graves consecuencias que la contaminación trae consigo.

Un ejemplo de control de calidad está descrito en las directrices de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos sobre los requisitos y controles aplicados al suero bovino utilizado en la producción de productos médicos veterinarios inmunológicos. En este se describe que el SFB debe tratarse de acuerdo a un método validado que inactive al VDVB; el suero debe analizarse antes del tratamiento de inactivación para evaluar el título infeccioso potencialmente presente y garantizar que está por debajo del nivel que se ha demostrado que es inactivado por el tratamiento (222).

Estos hallazgos, hacen hincapié en la importancia de incluir al VDVB como un patógeno que requiere medidas de control más estrictas, y diagnóstico oportuno, dirigiendo los esfuerzos a la detección y eliminación de los bovinos PI principalmente (184). Por otro lado, la vacunación es considerada una herramienta importante en el control de la DVB; sin embargo, por sí sola no

elimina el virus del rebaño, únicamente se utiliza para proveer protección contra infecciones transplacentarias que den origen a terneros PI y evitar la reintroducción de la enfermedad (146).

Con base en nuestros resultados, es clara la importancia de implementar el uso de pruebas para el control de calidad de materias primas de origen animal como las realizadas en este trabajo, debido a que la aplicación de tratamientos de inactivación del suero mediante radiación gamma o filtración, no siempre son 100% efectivos (193). Es importante considerar que existen múltiples factores que intervienen potencialmente en los procedimientos de inactivación por radiación gamma los cuales incluyen: la variabilidad de la matriz sérica, disposición del empaque del suero (incluyendo método de congelación del producto), condiciones de irradiación gamma, cepa y título del virus contaminante a inactivar y concentración de restos de cultivo celular. Así mismo existen variaciones en la aplicación de los métodos de irradiación y de los operadores en el procedimiento de inactivación. Como resultado de lo anterior, existen diversos estudios que determinan la efectividad en la inactivación del VDVB contaminante con resultados variables (223). Adicionalmente, los procedimientos utilizados para inactivar el suero bovino no siempre se aplican de manera eficiente o no son validados (184). Por lo anterior, se sugiere la implementación adicional de técnicas como la RT-PCR (98,185,194), el aislamiento viral (190) y la IHQ (196) por su alta sensibilidad y especificidad, las cuales permiten en primera instancia, detectar la presencia de material genético y en segundo lugar, establecer la infectividad de las partículas virales.

De la misma forma, la pureza, seguridad y eficacia de las vacunas virales requieren ser evaluadas mediante la aplicación de metodologías como las descritas en éste trabajo. Contar con controles de calidad desde el manejo de los animales hasta la utilización del SFB en el laboratorio, permitirá acercarnos al objetivo de minimizar e incluso erradicar el amplio impacto que el DVB tiene en la salud animal, principalmente en el ganado bovino además del impacto económico que hasta ahora tiene a nivel mundial.

## 8 CONCLUSIONES

- I) En el 100% de las muestras analizadas durante este estudio, se evidenció la presencia de material genético del VDVB mediante la técnica de RT-PCR utilizando los iniciadores previamente mencionados.
- II) Con base en el análisis de las secuencias obtenidas se demostró que los genotipos contaminantes del VDVB corresponden al VDVB 1b, 1a y 2a.
- III) Se logró el aislamiento del VDVB en 13 de 16 muestras de SFB, evidenciando su actividad biológica.
- IV) En este estudio se demostró que el proceso de inactivación por calor en baño María a 56°C durante 30 min, no es suficiente para inactivar al VDVB contaminante de SFB comerciales.

## 9 PROSPECTIVA

- Realizar estudios enfocados al control de calidad del SFB como los descritos en este trabajo para la detección del VDVB, aplicándolos dentro de laboratorios de referencia, investigación o producción de biológicos, contribuyendo a su vez a la validación de los procedimientos de inactivación viral aplicados en SFB, así como en productos biológicos terminados como las vacunas.
- Determinar el título viral del VDVB contaminante en SFB, para determinar su implicación en el uso de productos biológicos contaminados con este virus.
- Realizar estudios acerca de la distribución geográfica del VDVB, la tipificación de sus variantes, su incidencia y prevalencia, así como la proporción de los animales PI.
- Realizar estudios acerca del impacto económico que genera la enfermedad.

## 10 REFERENCIAS

1. Meyling A, Houe H, Jensen AM. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot.* marzo de 1990;9(1):75-93.
2. Wentink GH, van Exsel AC, de Goey I, van Lieshout JA. Spread of bovine virus diarrhoea virus in a herd of heifer calves. *Vet Q.* octubre de 1991;13(4):233-6.
3. Baker JC. The Clinical Manifestations of Bovine Viral Diarrhea Infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1 de noviembre de 1995;11(3):425-45.
4. Olafson P, McCallum A, Fox F. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 1946;36:205-2013.
5. Childs T. X Disease of Cattle — Saskatchewan. *Can J Comp Med Vet Sci.* noviembre de 1946;10(11):316-9.
6. Ramsy F, Chivers W. Mucosal disease of cattle. *North AM Vet.* 1953;34:629-33.
7. Gillespie J, Coggins L, Thompson J. Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease. *Cornell Vet.* 51:155-9.
8. Collett MS, Larson R, Belzer SK, Retzel E. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology.* julio de 1988;165(1):200-8.
9. Liess B. Cytopathogenicity discovery and impact in BVD research. En: *Proc Int Symp Bovine Viral Diarrhea Virus-a.* 1996. p. 23-5.
10. Gillespie JH, Coggins L, Thompson J, Baker JA. Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease. *Cornell Vet.* 1961;51:155.
11. Kniazeff AJ. Antigenic relationship of some bovine viral diarrhoea-mucosal disease viruses from the United States, Great Britain, and West Germany. *British Veterinary Association;* 1961.
12. Underdahl NR, Grace OD, Hoerlein AB. Cultivation in Tissue-Culture of Cytopathogenic Agent from Bovine Mucosal Disease. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1 de abril de 1957;94(4):795-7.
13. Underdahl NR, Grace OD, Hoerlein AB. Cultivation in Tissue-Culture of Cytopathogenic Agent from Bovine Mucosal Disease. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1 de abril de 1957;94(4):795-7.
14. Thomson RG, Savan M. Studies on Virus Diarrhea and Mucosal Disease of Cattle. *Can J Comp Med Vet Sci.* septiembre de 1963;27(9):207-14.
15. Kennedy P, Collier JC, Ramsey F. Report of the ad hoc committee on terminology for the symposium on immunity to the bovine respiratory disease complex. *J Am Vet Med Assoc.* 1968;156:940.
16. Darbyshire JH. Agar Gel Diffusion Studies with a Mucosal Disease of Cattle: II.—A Serological Relationship Between a Mucosal Disease and Swine Fever. *Res Vet Sci.* 1 de abril de 1962;3(2):125-8.
17. Plant JW, Littlejohns IE, Gardiner AC, Vantsis JT, Huck RA. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. *Vet Rec.* 28 de abril de 1973;92(17):455.
18. Pritchard WR. The bovine viral diarrhea-mucosal disease complex. *Adv Vet Sci.*

1963;8:1-47.

19. Malmquist WA. Bovine viral diarrhea-mucosal disease-etiology pathogenesis and applied immunity. Journal of the American veterinary medical Association. 1931 Meacham suite 100, Schaumburg. 1968. p. 763.
20. Bürki F, Germann E. Letale Pneumoenteritiden bei Kälbern verursacht durch den Erreger der bovinen Virus Diarrhoe. Berl Munch Tierarzt Wochensh. 1964;77:324-6.
21. Gillespie JH. Comments on bovine viral diarrhea-mucosal disease. Journal of the American veterinary medical Association. 1931 Meacham suite 100, Schaumburg, IL. 1968. p. 768.
22. Ward GM, Roberts SJ, McEntee K, Gillespie JH. A study of experimentally induced bovine viral diarrhea-mucosal disease in pregnant cows and their progeny. Cornell Vet. octubre de 1969;59(4):525-38.
23. Scott FW, Kahrs RF, De Lahunte A, Brown TT, McEntee K, Gillespie JH. Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. I. Cerebellar degeneration (hypoplasia), ocular lesions and fetal mummification following experimental infection with bovine viral diarrhea-mucosal disease virus. Cornell Vet. octubre de 1973;63(4):536-60.
24. Coria MF, McClurkin AW. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhea virus. J Am Vet Med Assoc. 15 de febrero de 1978;172(4):449-51.
25. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. Vet Rec. 2 de junio de 1984;114(22):535-6.
26. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. Res Vet Sci. mayo de 1989;46(3):307-11.
27. Pellerin C, van den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. Virology. septiembre de 1994;203(2):260-8.
28. Sockett D, Bolin D, Ridpath J, Bolin S. Outbreak of severe acute bovine virus diarrhea (BVD) in Wisconsin. En: Int Symp Bovine Viral Diarrhoea Virus A. 1996.
29. Radostits OM, Littlejohns IR. New Concepts in the Pathogenesis, Diagnosis and Control of Diseases Caused by the Bovine Viral Diarrhea Virus. Can Vet J. junio de 1988;29(6):513-28.
30. Corapi WV, Elliott RD, French TW, Arthur DG, Bezek DM, Dubovi EJ. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. J Am Vet Med Assoc. 15 de febrero de 1990;196(4):590-6.
31. Bolin SR, Ridpath JF. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. Am J Vet Res. noviembre de 1992;53(11):2157-63.
32. Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes. Virology. 15 de noviembre de 1994;205(1):66-74.
33. Vilček Š, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, et al. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. Arch Virol. enero de 2001;146(1):99-115.

34. Schirrmeier 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.* diciembre de 2004;85(Pt 12):3647-52.
35. Stalder HP, Meier Ph, Pfaffen G, Wageck-Canal C, Rüfenacht J, Schaller P, et al. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev Vet Med.* 15 de noviembre de 2005;72(1):37-41.
36. Cortez A, Heinemann MB, Castro AMMG de, Soares RM, Pinto AMV, Alfieri AA, et al. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pesqui Veterinária Bras.* diciembre de 2006;26(4):211-6.
37. Bianchi E, Martins M, Weiblen R, Flores EF. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). *Pesqui Veterinária Bras.* 2011;31(8):649-55.
38. Liu L, Xia H, Baule C, Belák S. Maximum likelihood and Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic characterization of a novel pestivirus, SVA/cont-08. *Arch Virol.* julio de 2009;154(7):1111-6.
39. Liu L, Kampa J, Belák S, Baule C. Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04\_KhonKaen. *Vet Microbiol.* julio de 2009;138(1-2):62-8.
40. Peletto S, Zuccon F, Pitti M, Gobbi E, Marco LD, Caramelli M, et al. Detection and phylogenetic analysis of an atypical pestivirus, strain IZSPLV\_To. *Res Vet Sci.* 1 de febrero de 2012;92(1):147-50.
41. Decaro N, Lucente MS, Mari V, Cirone F, Cordioli P, Camero M, et al. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(8):1549.
42. Mishra N, Rajukumar K, Pateriya A, Kumar M, Dubey P, Behera SP, et al. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet Microbiol.* 2014;174(1-2):239-46.
43. Haider N, Rahman MS, Khan SU, Mikolon A, Gurley ES, Osmani MG, et al. Identification and Epidemiology of a Rare HoBi-Like Pestivirus Strain in Bangladesh. *Transbound Emerg Dis.* 2014;61(3):193-8.
44. Pecora A, Pérez Aguirreburualde MS, Malacari DA, Zabal O, Sala JM, Konrad JL, et al. Serologic evidence of HoBi-like virus circulation in Argentinean water buffalo. *J Vet Diagn Invest.* noviembre de 2017;29(6):926-9.
45. Afify AF, Hassanien RT, Abdelmegeed HK, Abouelyazeed EA, Ali MH, Abdelwahed DA, et al. First detection of emerging HoBi-like Pestivirus (BVD-3) among some persistently infected dairy cattle herds in Egypt. *Trop Anim Health Prod.* 2022;54(6):336.
46. Yeşilbaş K, Alpay G, Becher P. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses.* junio de 2017;9(6):128.
47. Bolin SR. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* noviembre de 1995;11(3):615-25.
48. Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, et al. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol.* 2001;146(1):99-115.
49. Deng R, Brock KV. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and

secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res.* 25 de abril de 1993;21(8):1949-57.

50. Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol.* 1994;136(3-4):309-23.

51. Letellier C, Kerkhofs P. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol Methods.* 1 de diciembre de 2003;114(1):21-7.

52. Giammarioli M, Ridpath JF, Rossi E, Bazzucchi M, Casciari C, De Mia GM. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals.* 1 de julio de 2015;43(4):220-4.

53. Tian B, Cai D, Li W, Bu Q, Wang M, Ye G, et al. Identification and genotyping of a new subtype of bovine viral diarrhoea virus 1 isolated from cattle with diarrhoea. *Arch Virol.* abril de 2021;166(4):1259-62.

54. Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci.* 23 de noviembre de 1999;96(24):13910-3.

55. Houe H. Risk assessment. En: *Bovine viral diarrhoea virus diagnosis, management, and control.* Oxford, UK: Goyal SM, Ripath JF; 2005. p. 35-64.

56. Houe H, Lindberg A, Moennig V. Test Strategies in Bovine Viral Diarrhoea Virus Control and Eradication Campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest.* septiembre de 2006;18(5):427-36.

57. Polak MP, Zmudzinski JF. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in bulls in artificial insemination centers in Poland. *Vet Microbiol.* enero de 1999;64(2-3):253-7.

58. Brock KV, Redman DR, Vickers ML, Irvine NE. Quantitation of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Embryo Transfer Flush Fluids Collected from a Persistently Infected Heifer. *J Vet Diagn Invest.* enero de 1991;3(1):99-100.

59. Falcone E, Tollis M, Conti G. Bovine viral diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine.* 14 de octubre de 1999;18(5-6):387-8.

60. Makoschey B, Gelder PTJA v, Keijsers V, Goovaerts D. Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. *Biologicals.* 1 de septiembre de 2003;31(3):203-8.

61. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol.* enero de 1999;64(2-3):89-107.

62. Woods RD, Kunkle RA, Ridpath JE, Bolin SR. Bovine viral diarrhoea virus isolated from fetal calf serum enhances pathogenicity of attenuated transmissible gastroenteritis virus in neonatal pigs. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* septiembre de 1999;11(5):400-7.

63. ICTV [Internet] Disponible en: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=201903153](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201903153)

64. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol.* 1 de enero de 2017;98(1):2-3.

65. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary Virology.* En: Third edition. Academic Press; 1999. p. 555-569. 629 págs.

66. Poole TL, Wang C, Popp RA, Potgieter LND, Siddiqui A, Collett MS. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology*. enero de 1995;206(1):750-4.
67. Pankraz A, Thiel HJ, Becher P. Essential and Nonessential Elements in the 3' Nontranslated Region of Bovine Viral Diarrhea Virus. *J Virol*. 1 de julio de 2005;79(14):9119-27.
68. A Stem-Loop Motif Formed by the Immediate 5' Terminus of the Bovine Viral Diarrhea Virus Genome Modulates Translation as well as Replication of the Viral RNA | *Journal of Virology*. [Internet] Disponible en: <https://jvi.asm.org/content/74/13/5825>
69. Brock KV, Deng R, Riblet SM. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhea virus by RNA ligation and PCR. *J Virol Methods*. 1 de julio de 1992;38(1):39-46.
70. Wilhelm Grassmann C, Yu H, Isken O, Behrens SE. Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: implications for the viral life cycle. *Virology*. 15 de marzo de 2005;333(2):349-66.
71. Ridpath JF, Bolin SR. Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res*. agosto de 1997;50(2):237-43.
72. Becher P, Orlich M, Kosmidou A, König M, Baroth M, Thiel HJ. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*. 15 de septiembre de 1999;262(1):64-71.
73. Tautz N, Tews BA, Meyers G. The Molecular Biology of Pestiviruses. *Adv Virus Res*. 2015;93:47-160.
74. Thiel HJ, Stark R, Weiland E, Rümenapf T, Meyers G. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol*. septiembre de 1991;65(9):4705-12.
75. Krey T, Bontems F, Vonnrhein C, Vaney MC, Bricogne G, Rümenapf T, et al. Crystal structure of the pestivirus envelope glycoprotein E(rns) and mechanistic analysis of its ribonuclease activity. *Struct Lond Engl* 1993. 9 de mayo de 2012;20(5):862-73.
76. Donis RO, Corapi W, Dubovi EJ. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J Gen Virol*. enero de 1988;69 ( Pt 1):77-86.
77. Gottipati K, Acholi S, Ruggli N, Choi KH. Autocatalytic activity and substrate specificity of the pestivirus N-terminal protease Npro. *Virology*. 1 de marzo de 2014;452-453:303-9.
78. Elbers K, Tautz N, Becher P, Stoll D, Rümenapf T, Thiel HJ. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J Virol*. 1 de junio de 1996;70(6):4131-5.
79. Harada T, Tautz N, Thiel HJ. E2-p7 Region of the Bovine Viral Diarrhea Virus Polyprotein: Processing and Functional Studies. *J Virol*. 15 de octubre de 2000;74(20):9498-506.
80. Behrens SE, Grassmann CW, Thiel HJ, Meyers G, Tautz N. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol*. marzo de 1998;72(3):2364-72.
81. Lackner T, Thiel HJ, Tautz N. Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31 de enero de 2006;103(5):1510-5.
82. Tamura JK, Warrenner P, Collett MS. RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology*. marzo de 1993;193(1):1-

10.

83. Grassmann CW, Isken O, Behrens SE. Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *J Virol.* noviembre de 1999;73(11):9196-205.

84. Xu J, Mendez E, Caron PR, Lin C, Murcko MA, Collett MS, et al. Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polypeptide cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol.* 1 de julio de 1997;71(7):5312-22.

85. Collett MS, Wiskerchen MA, Welniak E, Belzer SK. Bovine viral diarrhea virus genomic organization. En: Liess B, Moennig V, Pohlenz J, Trautwein G, editores. *Ruminant Pestivirus Infections*. Vienna: Springer; 1991. p. 19-27. (Archives of Virology).

86. Qu L, McMullan LK, Rice CM. Isolation and Characterization of Noncytopathic Pestivirus Mutants Reveals a Role for Nonstructural Protein NS4B in Viral Cytopathogenicity. *J Virol.* 15 de noviembre de 2001;75(22):10651-62.

87. Isken O, Langerwisch U, Schönherr R, Lamp B, Schröder K, Duden R, et al. Functional characterization of bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 5A by reverse genetic analysis and live cell imaging. *J Virol.* enero de 2014;88(1):82-98.

88. Lai VCH, Kao CC, Ferrari E, Park J, Uss AS, Wright-Minogue J, et al. Mutational Analysis of Bovine Viral Diarrhea Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol.* 1 de diciembre de 1999;73(12):10129-36.

89. Lohmann V, Overton H, Bartenschlager R. Selective Stimulation of Hepatitis C Virus and Pestivirus NS5B RNA Polymerase Activity by GTP\*. *J Biol Chem.* 16 de abril de 1999;274(16):10807-15.

90. Liu L, Xia H, Wahlberg N, Belák S, Baule C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology.* 15 de marzo de 2009;385(2):351-7.

91. Bauermann FV, Flores EF, Ridpath JF. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* marzo de 2012;24(2):253-61.

92. Bolin SR, Grooms DL. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* marzo de 2004;20(1):51-68.

93. Holland JJ, de la Torre JC, Clarke DK, Duarte E. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J Virol.* junio de 1991;65(6):2960-7.

94. Donis RO. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* noviembre de 1995;11(3):393-423.

95. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science.* 26 de marzo de 1982;215(4540):1577-85.

96. Bolin S, Moennig V, Kelso Gourley NE, Ridpath J. Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhea virus into groups. *Arch Virol.* 1 de marzo de 1988;99(1):117-23.

97. Ridpath JF, Bolin SR, Katz J. Comparison of nucleic acid hybridization and nucleic acid amplification using conserved sequences from the 5' noncoding region for detection of bovine viral diarrhea virus. *J Clin Microbiol.* abril de 1993;31(4):986-9.

98. Vilcek S. [Development of PCR tests for the detection of bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial viruses and pestiviruses]. *Vet Med (Praha)*. 1994;39(11):687-700.
99. Yamamoto T, Kozasa T, Aoki H, Sekiguchi H, Morino S, Nakamura S. Genomic analyses of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005. *Vet Microbiol*. 1 de marzo de 2008;127(3-4):386-91.
100. Vilcek S, Mojzisev J, Bajov V, Paulk S, Strojny L, Durkovic B, et al. A survey for BVDV antibodies in cattle farms in Slovakia and genetic typing of BVDV isolates from imported animals. *Acta Vet Hung*. 2003;51(2):229-36.
101. Deng M, Ji S, Fei W, Raza S, He C, Chen Y, et al. Prevalence Study and Genetic Typing of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in Four Bovine Species in China. *PLOS ONE*. 7 de abril de 2015;10(4):e0121718.
102. Shi H, Kan Y, Yao L, Leng C, Tang Q, Ji J, et al. Identification of Natural Infections in Sheep/Goats with HoBi-like Pestiviruses in China. *Transbound Emerg Dis*. octubre de 2016;63(5):480-4.
103. Kozasa T, Torii S, Kameyama K ichiro, Nagai M, Isoda N, Shiokawa M, et al. Prevalence of HoBi-like viruses in Japan between 2012 and 2017 based on virological methods and serology [Internet]. Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University; 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.14943/jjvr.66.4.317>
104. Pecora A, Perez Aguirreburualde MS, Ridpath JF, Dus Santos MJ. Molecular Characterization of Pestiviruses in Fetal Bovine Sera Originating From Argentina: Evidence of Circulation of HoBi-Like Viruses. *Front Vet Sci*. 16 de octubre de 2019;6:359.
105. Timurkan M, Aydın H. Increased genetic diversity of BVDV strains circulating in Eastern Anatolia, Turkey: first detection of BVDV-3 in Turkey. *Trop Anim Health Prod*. septiembre de 2019;51(7):1953-61.
106. Lee KM, Gillespie JH. Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. *Am J Vet Res*. octubre de 1957;18(69):952-3.
107. Gillespie JH, Baker JA, McENTEE K. A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet*. enero de 1960;50:73-9.
108. Meyers G, Tautz N, Dubovi EJ, Thiel HJ. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology*. 1 de febrero de 1991;180(2):602-16.
109. Tautz N, Meyers G, Stark R, Dubovi EJ, Thiel HJ. Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. *J Virol*. noviembre de 1996;70(11):7851-8.
110. Meyers G, Tautz N, Stark R, Brownlie J, Dubovi EJ, Collett MS, et al. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*. 1 de noviembre de 1992;191(1):368-86.
111. Kummerer BM, Stoll D, Meyers G. Bovine Viral Diarrhea Virus Strain Oregon: a Novel Mechanism for Processing of NS2-3 Based on Point Mutations. *J Virol*. mayo de 1998;72(5):4127-38.
112. Kummerer BM, 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*. enero de 2000;74(1):390-400.
113. Tautz N, Thiel HJ, Dubovi EJ, Meyers G. Pathogenesis of mucosal disease: a

cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. J Virol. mayo de 1994;68(5):3289-97.

114. Lambot M, Douart A, Joris E, Letesson JJ, Pastoret PP 1997. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. J Gen Virol. 78(5):1041-7.

115. Becker Y. Evolution of viruses by acquisition of cellular RNA or DNA nucleotide sequences and genes: an introduction. Virus Genes. 2000;21(1-2):7-12.

116. Quadros VL, Mayer SV, Vogel FSF, Weiblen R, Brum MCS, Arenhart S, et al. A search for RNA insertions and NS3 gene duplication in the genome of cytopathic isolates of bovine viral diarrhoea virus. Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol. julio de 2006;39(7):935-44.

117. Donis RO, Dubovi EJ. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. Virology. mayo de 1987;158(1):168-73.

118. Lackner T, Müller A, Pankraz A, Becher P, Thiel HJ, Gorbalenya AE, et al. Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus. J Virol. octubre de 2004;78(19):10765-75.

119. Deregt D, Loewen KG. Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. Can Vet J. junio de 1995;36(6):371-8.

120. Peterhans E, Schweizer M. Pestiviruses: how to outmaneuver your hosts. Vet Microbiol. 21 de abril de 2010;142(1-2):18-25.

121. Baker JC. Bovine viral diarrhoea virus: a review. J Am Vet Med Assoc. 1 de junio de 1987;190(11):1449-58.

122. Moennig V, Liess B. Pathogenesis of Intrauterine Infections With Bovine Viral Diarrhoea Virus. Vet Clin North Am Food Anim Pract. noviembre de 1995;11(3):477-87.

123. Peterhans E, Schweizer M. BVDV: a pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. Biol J Int Assoc Biol Stand. enero de 2013;41(1):39-51.

124. Donis RO, Dubovi EJ. Characterization of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. J Gen Virol. junio de 1987;68 ( Pt 6):1597-605.

125. Hulst MM, Moormann RJ. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. J Gen Virol. noviembre de 1997;78 ( Pt 11):2779-87.

126. Liang D, Sainz IF, Ansari IH, Gil LH, Vassilev V, Donis RO. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. J Gen Virol. 2003;84(5):1269-74.

127. Iqbal M, Flick-Smith H, McCauley JW. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. J Gen Virol. febrero de 2000;81(Pt 2):451-9.

128. Schelp C, Greiser-Wilke I, Wolf G, Beer M, Moennig V, Liess B. Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection. Arch Virol. 1995;140(11):1997-2009.

129. Xue W, Minocha HC. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J Gen Virol.* enero de 1993;74 ( Pt 1):73-9.
130. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 de octubre de 1999;96(22):12766-71.
131. Lecot S, Belouzard S, Dubuisson J, Rouillé Y. Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* agosto de 2005;79(16):10826-9.
132. Mathapati BS, Mishra N, Rajukumar K, Nema RK, Behera SP, Dubey SC. Entry of bovine viral diarrhea virus into ovine cells occurs through clathrin-dependent endocytosis and low pH-dependent fusion. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* mayo de 2010;46(5):403-7.
133. Lindenbach B, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. *Fields Virol.* 1 de enero de 2007;1101-51.
134. Goyal SM, Ridpath JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2008. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=84889337942&partnerID=8YFLogxK>
135. Warrilow D, Lott WB, Greive S, Gowans EJ. Properties of the bovine viral diarrhoea virus replicase in extracts of infected MDBK cells. *Arch Virol.* 2000;145(10):2163-71.
136. Apte-Sengupta S, Sirohi D, Kuhn RJ. Coupling of Replication and Assembly in Flaviviruses. *Curr Opin Virol.* diciembre de 2014;0:134-42.
137. 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.* noviembre de 2001;82(Pt 11):2597-605.
138. Houe H. Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* noviembre de 1995;11(3):521-47.
139. G PC. Presencia de anticuerpos contra rinotraqueitis infecciosa, diarrea viral bovina, parainfluenza 3, brucelosis, leptospirosis, vibriosis y haemophilus somnus en sueros de bovinos con problemas patológicos reproductores y respiratorios. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; 1975.
140. Milián-Suazo F, Hernández-Ortiz R, Hernández-Andrade L, Alvarado-Islas A, Díaz-Aparicio E, Mejía-Estrada F, et al. Seroprevalence and risk factors for reproductive diseases in dairy cattle in Mexico. *J Vet Med Anim Health* [Internet]. 2016 (8). Disponible en: <https://www.readcube.com/articles/10.5897%2Fjvmah2016.0483>
141. Gómez-Romero N, Basurto-Alcántara FJ, Verdugo-Rodríguez A, Bauermann FV, Ridpath JF. Genetic diversity of bovine viral diarrhea virus in cattle from Mexico. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* mayo de 2017;29(3):362-5.
142. Jocelyn Medina Gudiño. Detección y genotipificación de pestivirus en ungulados de fauna silvestre en cautiverio en México. [Internet]. [Ciudad de México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2020. Disponible en: <https://tesiunam.dgb.unam.mx>
143. SINAVE. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Informes de situación Zoonositaria Nacional [Internet]. 2012. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/505729/12.\\_Acuerdo\\_enfermedades-Pecuario.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/505729/12._Acuerdo_enfermedades-Pecuario.pdf)

144. Fernández JVR, Utrera ÁR, Martínez JPZ, Jenkins SO, Zurita LG, Islas AF, et al. Prevalencia de anticuerpos contra diarrea viral bovina en vacas no vacunadas en los estados de Puebla, Tabasco y Veracruz, México. *Rev Mex Cienc Pecu.* 29 de junio de 2018;9(3):555-66.
145. Zavaleta JA, Utrera ÁR, Fernández JVR, Camacho AG, Martínez JPZ. Prevalencia de rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en hembras en tres épocas del año en la Zona Centro de Veracruz. *Nova Sci.* 30 de mayo de 2016;8(16):213-27.
146. Brownlie J, Thompson I, Curwen A. Bovine virus diarrhoea virus - strategic decisions for diagnosis and control. In *Pract.* abril de 2000;22(4):176-87.
147. Solis-Calderon JJ, Segura-Correa VM, Segura-Correa JC. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. *Prev Vet Med.* 12 de diciembre de 2005;72(3):253-62.
148. Heuer C, Healy A, Zerbini C. Economic Effects of Exposure to Bovine Viral Diarrhea Virus on Dairy Herds in New Zealand. *J Dairy Sci.* 1 de diciembre de 2007;90(12):5428-38.
149. Yarnall MJ, Thrusfield MV. Engaging veterinarians and farmers in eradicating bovine viral diarrhoea: a systematic review of economic impact. *Vet Rec.* 30 de septiembre de 2017;181(13):347.
150. Terrestrial Manual Online Access [Internet]. OIE - World Organisation for Animal Health. Disponible en: <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>
151. Confer AW, Fulton RW, Step DL, Johnson BJ, Ridpath JF. Viral Antigen Distribution in the Respiratory Tract of Cattle Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus Subtype 2a. *Vet Pathol.* 1 de marzo de 2005;42(2):192-9.
152. Bruschke CJ, Weerdmeester K, Van Oirschot JT, Van Rijn PA. Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet Microbiol.* noviembre de 1998;64(1):23-32.
153. Tråvén M, Alenius S, Fossum C, Larsson B. Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf. *Zentralblatt Vet Reihe B J Vet Med Ser B.* agosto de 1991;38(6):453-62.
154. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* mayo de 2003;15(3):221-32.
155. Wilhelmsen CL, Bolin SR, Ridpath JF, Cheville NF, Kluge JP. Experimental Primary Postnatal Bovine Viral Diarrhea Viral Infections in Six-month-old Calves. *Vet Pathol.* 1 de julio de 1990;27(4):235-43.
156. Ellis JA, West KH, Cortese VS, Myers SL, Carman S, Martin KM, et al. Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhea virus-type II. *Can J Vet Res.* julio de 1998;62(3):161-9.
157. Odeón AC, Kelling CL, Marshall DJ, Estela ES, Dubovi EJ, Donis RO. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93). *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* mayo de 1999;11(3):221-8.
158. Stoffregen B, Bolin SR, Ridpath JF, Pohlenz J. Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. *Vet Microbiol.* 15 de noviembre de 2000;77(1-2):157-62.

159. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JE, Neill JD. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral diarrhea virus type 2 in calves. *Am J Vet Res.* noviembre de 2002;63(11):1575-84.
160. Marshall DJ, Moxley RA, Kelling CL. Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *Vet Pathol.* mayo de 1996;33(3):311-8.
161. Archambault D, Béliveau C, Couture Y, Carman S. Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Vet Res.* abril de 2000;31(2):215-27.
162. Hamers C, Couvreur B, Dehan P, Letellier C, Lewalle P, Pastoret PP, et al. Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea viral strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Vet J Lond Engl* 1997. noviembre de 2000;160(3):250-8.
163. Ridpath JF, Neill JD, Frey M, Landgraf JG. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol.* 15 de noviembre de 2000;77(1-2):145-55.
164. Meyling A, Jensen AM. Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet Microbiol.* junio de 1988;17(2):97-105.
165. Stringfellow DA, Givens MD. Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. *Anim Reprod Sci.* 2 de julio de 2000;60-61:629-42.
166. Lang-Ree JR, Vatn T, Kommisrud E, Løken T. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. *Vet Rec.* 22 de octubre de 1994;135(17):412-3.
167. Gunn HM. Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec.* 5 de junio de 1993;132(23):584-5.
168. Moerman A, Straver PJ, de Jong MC, Quak J, Baanvinger T, van Oirschot JT. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. *Vet Q.* julio de 1994;16(2):115-9.
169. Rondón I. Diarre viral bovina: Patogénesis e inmunopatología. *Rev MVZ Córdoba.* enero de 2006;11(1):694-704.
170. Brownlie J. Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease in cattle. *In Pract.* 1 de diciembre de 1985;7:195-202.
171. Perdrizet, J. A., Rebhun, W. C., Dubovi, E. J., & Donis, R. O. Bovine virus diarrhea-clinical syndromes in dairy herds. *Cornell Vet.* 1987;77(1), 46.
172. David GP, Crawshaw TR, Gunning RF, Hibberd RC, Lloyd GM, Marsh PR. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet Rec.* 30 de abril de 1994;134(18):468-72.
173. Carman S, van Dreumel T, Ridpath J, Hazlett M, Alves D, Dubovi E, et al. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* enero de 1998;10(1):27-35.
174. Rebhun WC, French TW, Perdrizet JA, Dubovi EJ, Dill SG, Karcher LF. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J Vet Intern Med.* marzo de 1989;3(1):42-6.

175. Wittum TE, Grotelueschen DM, Brock KV, Kvasnicka WG, Floyd JG, Kelling CL, et al. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. *Prev Vet Med.* 13 de abril de 2001;49(1-2):83-94.
176. Done JT, Terlecki S, Richardson C, Harkness JW, Sands JJ, Patterson DS, et al. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet Rec.* 1 de junio de 1980;106(23):473-9.
177. Dubovi EJ. Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* noviembre de 1994;10(3):503-14.
178. Muñoz-Zanzi CA, Hietala SK, Thurmond MC, Johnson WO. Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhea virus in dairy calves. *Am J Vet Res.* marzo de 2003;64(3):358-65.
179. Windsor P. 9 - Abnormalities of Development and Pregnancy. En: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, editores. *Veterinary Reproduction and Obstetrics (Tenth Edition)* [Internet]. St. Louis (MO): W.B. Saunders; 2019. p. 168-94. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702072338000094>
180. Ohmann HB, Jensen MH, Sørensen KJ, Dalsgaard K. Experimental fetal infection with bovine viral diarrhea virus. I. Virological and serological studies. *Can J Comp Med Rev Can Med Comp.* octubre de 1982;46(4):357-62.
181. McClurkin AW, Littledike ET, Cutlip RC, Frank GH, Coria MF, Bolin SR. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. *Can J Comp Med.* 1984;48(2):156.
182. Roeder PL, Harkness JW. BVD virus infection: prospects for control. *Vet Rec.* 8 de febrero de 1986;118(6):143-7.
183. Brownlie J. The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. En: Liess B, Moennig V, Pohlenz J, Trautwein G, editores. *Ruminant Pestivirus Infections* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 1991. p. 79-96. (Archives of Virology; vol. 3). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-9153-8\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-9153-8_10)
184. EDQM. Proceedings of a workshop on Pestivirus contamination of bovine sera and other bovine virus contamination. 2001.
185. Bolin SR, Ridpath JF, Black J, Macy M, Roblin R. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhea virus. *J Virol Methods.* julio de 1994;48(2-3):211-21.
186. Bolin SR, Ridpath JF. Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus Genotypes and Antibody against those Viral Genotypes in Fetal Bovine Serum. *J Vet Diagn Invest.* abril de 1998;10(2):135-9.
187. Xia H, Vijayaraghavan B, Belák S, Liu L. Detection and Identification of the Atypical Bovine Pestiviruses in Commercial Foetal Bovine Serum Batches. *PLoS ONE.* 8 de diciembre de 2011;6(12):e28553.
188. Harasawa R, Tomiyama T. Evidence of pestivirus RNA in human virus vaccines. *J Clin Microbiol.* junio de 1994;32(6):1604-5.
189. Wessman SJ, Levings RL. Collective experiences of adventitious viruses of animal-derived raw materials and what can be done about them. *Cytotechnology.* noviembre de 1998;28(1-3):43-8.

190. Molander CW, Kniazeff AJ, Boone CW, Paley A, Imagawa DT. Isolation and characterization of viruses from fetal calf serum. *In Vitro*. noviembre de 1971;7(3):168-73.
191. Kniazeff AJ, Wopschall LJ, Hopps HE, Morris CS. Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture. *In Vitro*. diciembre de 1975;11(6):400-3.
192. Nuttall PA, Luther PD, Stott EJ. Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures. *Nature*. abril de 1977;266(5605):835-7.
193. Bolin SR, Matthews PJ, Ridpath JF. Methods for Detection and Frequency of Contamination of Fetal Calf Serum with Bovine Viral Diarrhea Virus and Antibodies against Bovine Viral Diarrhea Virus. *J Vet Diagn Invest*. 1 de julio de 1991;3(3):199-203.
194. Zabal O, Kobrak AL, Lager IA, Schudel AA, Weber EL. [Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhea virus]. *Rev Argent Microbiol*. marzo de 2000;32(1):27-32.
195. Yanagi M, Bukh J, Emerson SU, Purcell RH. Contamination of Commercially Available Fetal Bovine Sera with Bovine Viral Diarrhea Virus Genomes: Implications for the Study of Hepatitis C Virus in Cell Cultures. *J Infect Dis*. 1 de diciembre de 1996;174(6):1324-7.
196. Stringfellow DA, Riddell KP, Givens MD, Galik PK, Sullivan E, Dykstra CC, et al. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) in cell lines used for somatic cell cloning. *Theriogenology*. 1 de marzo de 2005;63(4):1004-13.
197. Audet SA, Crim RL, Beeler J. Evaluation of Vaccines, Interferons and Cell Substrates for Pestivirus Contamination. *Biologicals*. marzo de 2000;28(1):41-6.
198. Giangaspero M, Vacirca G, Harasawa R, Büttner M, Panuccio A, De Giuli Morghen C, et al. Genotypes of pestivirus RNA detected in live virus vaccines for human use. *J Vet Med Sci*. julio de 2001;63(7):723-33.
199. Studer E, Bertoni G, Candrian U. Detection and characterization of pestivirus contaminations in human live viral vaccines. *Biol J Int Assoc Biol Stand*. diciembre de 2002;30(4):289-96.
200. Barkema HW, Bartels CJ, van Wuijckhuise L, Hesselink JW, Holzhauer M, Weber MF, et al. [Outbreak of bovine virus diarrhea on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhea virus type 2]. *Tijdschr Diergeneesk*. 15 de marzo de 2001;126(6):158-65.
201. Laassri M, Mee ET, Connaughton SM, Manukyan H, Gruber M, Rodriguez-Hernandez C, et al. Detection of bovine viral diarrhoea virus nucleic acid, but not infectious virus, in bovine serum used for human vaccine manufacture. *Biol J Int Assoc Biol Stand*. septiembre de 2018;55:63-70.
202. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 11 de noviembre de 1994;22(22):4673-80.
203. A HT. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999;41:95-8.
204. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. julio de 2016;33(7):1870-4.
205. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions

- through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* diciembre de 1980;16(2):111-20.
206. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J Mol Evol.* 1 de noviembre de 1981;17(6):368-76.
  207. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution.* 1985;39(4):783-91.
  208. Birk AV, Dubovi EJ, Cohen-Gould L, Donis R, Szeto HazelH. Cytoplasmic vacuolization responses to cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res.* 1 de marzo de 2008;132(1):76-85.
  209. Suthipintawong C, Leong ASY, Vinyuvat S. Immunostaining of cell preparations: A comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn Cytopathol.* 1996;15(2):167-74.
  210. Kozasa T, Aoki H, Nakajima N, Fukusho A, Ishimaru M, Nakamura S. Methods to select suitable fetal bovine serum for use in quality control assays for the detection of adventitious viruses from biological products. *Biologicals.* julio de 2011;39(4):242-8.
  211. Froud SJ. The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Dev Biol Stand.* 1999;99:157-66.
  212. Gong Y, Trowbridge R, Mackintosh S, Shannon A, Gowans EricJ. A stable cell line with a proportion of cells persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol.* octubre de 1998;63(2-4):117-24.
  213. Liess B, Moennig V. Ruminant pestivirus infection in pigs. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot.* marzo de 1990;9(1):151-61.
  214. Wensvoort G, Terpstra C. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Res Vet Sci.* septiembre de 1988;45(2):143-8.
  215. Fulton RW, Ridpath JF, Ore S, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, et al. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet Microbiol.* 30 de noviembre de 2005;111(1-2):35-40.
  216. Ridpath JF, Fulton RW, Kirkland PD, Neill JD. Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* marzo de 2010;22(2):184-91.
  217. Van Campen H, Ridpath J, Williams E, Cavender J, Edwards J, Smith S, et al. Isolation of bovine viral diarrhea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *J Wildl Dis.* abril de 2001;37(2):306-11.
  218. Passler T, Ditchkoff SS, Walz PH. Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *Front Microbiol* [Internet]. 2016 ;7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00945>
  219. Lertora JW, Negrette MS, Montenegro MA, Frías ML. Consideraciones técnicas sobre un método inmunohistoquímico para la detección del virus diarrea viral bovina en tejido fijado en formalina. *Rev Vet.* 1 de enero de 2007;18(1):58-61.
  220. Tuncer-Göktuna P, Yesilbag K. Bovine Viral Diarrhea Virus Propagates in Cell Culture

after Inoculation of Inactivated Sera from Persistently Infected Calves/ Persiste Enfekte Buzağların İnaktive Edilmiş Serumlarından Bovine Viral Diyare Virusu İzolasyonu. Uludağ Üniversitesi Vet Fakültesi Derg. 12 de diciembre de 2016;35:7-10.

221. Gómez-Romero N, Velazquez-Salinas L, Ridpath JF, Verdugo-Rodríguez A, Basurto-Alcántara FJ. Detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus found contaminating commercial veterinary vaccines, cell lines, and fetal bovine serum lots originating in Mexico. Arch Virol. 1 de julio de 2021;166(7):1999-2003.

222. EMA. Requirements and controls applied to bovine serum used in the production of immunological veterinary medicinal products [Internet]. European Medicines Agency. 2018. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/requirements-controls-applied-bovine-serum-used-production-immunological-veterinary-medicinal>

223. Nims RW, Gauvin G, Plavsic M. Gamma irradiation of animal sera for inactivation of viruses and mollicutes – A review. Biologicals. noviembre de 2011;39(6):370-7.