UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA MEDIANTE TRANSCRIPTASA REVERSA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y SECUENCIACIÓN A PARTIR DE MUESTRAS DE SUEROS DE BOVINOS PROVENIENTES DE LA CUENCA LECHERA DE LA LAGUNA, MÉXICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

VÍCTOR ABRAHAM ROLDÁN RODRÍGUEZ

ASESORES

Dra. NINNET EVELYN GÓMEZ ROMERO

Dr. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2023

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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

Este trabajo está dedicado especialmente a mi papá Felipe, quien siempre me cuido, me procuro y me brindo todo su apoyo y cariño para convertirme en lo que siempre soñé, sin el nada de esto podría haber sido posible. Ojalá la vida nos hubiera regalado un poquito más de tiempo juntos para que te sintieras orgulloso de lo que he logrado y estoy por lograr, te amo y espero que donde quiera que estés puedas ver todos los triunfos que estamos por lograr, siempre serás parte de mi vida.

A mi mamá Blanca, quien me ha brindado todo su apoyo y amor para lograr cada paso que doy, gracias por ser uno de mis pilares más fuertes, por mostrarme la fortaleza a pesar de todas las pruebas que la vida nos ha puesto. Te amo y este trabajo también lleva mucho de tu esfuerzo como madre, el triunfo es para los dos, gracias má.

A mis hermanos Damián, Ángel, Valeria, Clara y Jorge, porque el amor de hermanos siempre es un impulso y una motivación para seguir adelante, gracias por su apoyo y sus consejos, saben que siempre contarán conmigo para lo que sea.

A Laura Vázquez, por ser uno de mis principales motores durante todo este proyecto, quien mejor que nadie conoce todo el esfuerzo que puse para que se concluyera este trabajo, siempre supiste como apoyarme y aconsejarme cuando más lo necesite y nunca me dejaste caer. No sabes cuánto agradezco a la vida por haberme regalado un amor tan lindo y puro como el que me das día a día incondicionalmente, sé que juntos llegaremos tan lejos como nos lo propongamos. Gracias por tanto.

Al Dr. Francisco Basurto, gracias por aceptarme en su laboratorio en donde más que un grupo de trabajo encontré una segunda familia, siempre sé que fue un gran acierto el haber tomado la decisión de trabajar con usted. También le agradezco el seguir creyendo en mí y permitirme concluir este proyecto a pesar de las inconsistencias que tuve durante su desarrollo.

A Ninnet, por siempre creer en mí y nunca tirar la toalla con este trabajo, no sabes cuánto valoro trabajar contigo, siempre has sido como una hermana mayor a quien admiro muchísimo además de ser mi mayor ejemplo a seguir, algún día quiero lograr una parte de lo que tú has logrado, gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado como un profesionista integro, por ser mi casa de estudios y haberme dado tanto para lograr concluir mis estudios de educación media superior y superior.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme dado todas las herramientas necesarias para convertirme en un MVZ competente ante el mundo laboral.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN217219 “Identificación y caracterización genética de cepas del virus de la diarrea viral bovina circulantes en poblaciones ganaderas de México” por otorgar el financiamiento para el desarrollo del presente trabajo.

Al honorable jurado, el Dr. Pedro Ochoa Galván, el Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, el Dr. Evaristo Álvaro Barragán Hernández, el Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara y el Dr. Miguel Ángel Quiroz Martínez Martínez por sus valiosos comentarios y aportaciones para enriquecer el presente trabajo.

Al Dr. Ramón Delgado González, director de la UAAAN unidad Laguna por el apoyo que nos brindó para poder acceder al muestreo de los animales.

Al Dr. Eduardo Luna y todo el personal de la Unión Ganadera Regional de la Laguna por el apoyo durante el proceso de la toma de muestras y su procesamiento para su conservación.

Al Dr. Saúl Gutiérrez por darnos la oportunidad de ingresar a una de las producciones para la obtención de una parte del total de las muestras obtenidas.

A mis amigos del Laboratorio de Vacunología y Constatación: Ninnet, Jocelyn, Adolfo, Silvia, Ana Gaby, Yaya, Isa y Raúl, quienes hicieron que el trabajo en el laboratorio fuera más ameno y agradable.

Al Dr. Antonio Verdugo y todos los integrantes del Laboratorio de Microbiología Molecular: Lázaro, Julio, Cloé, Salvador, Leonardo, Vilchis y Cres por sus

comentarios y aportaciones durante los seminarios para mejorar el contenido del presente trabajo.

Al MVZ José Armando Reyes Fernández y a la M. en C. Ana Gabriela Reyes Montellano por recibirnos tan cálidamente y apoyarnos durante nuestra estancia en Torreón, Coahuila para la obtención de las muestras ocupadas para el presente trabajo.

Al personal del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM que colaboró y aportó algo para la obtención del presente trabajo.

A todas las personas, familia y amigos, que han estado presentes durante este proceso de aprendizaje y que de alguna manera han apoyado mi formación y mi crecimiento profesional.

A todos los animales de enseñanza que han ayudado a mi formación y aquellos que han formado parte de mi vida y me han motivado a crecer día a día como Médico Veterinario Zootecnista.

CONTENIDO

TEMA	PÁGINA
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Características del virus	2
1.3 Genotipos y subgenotipos	3
1.4 Biotipos	5
1.5 Replicación	6
1.6 Patogenia y patogénesis	7
1.7 Diagnóstico	12
1.8 Control y prevención	14
1.9 Epidemiología	17
1.10 Situación del VDVB en México	19
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVO	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos particulares	24
5. MATERIAL Y MÉTODOS	25
5.1 Toma de muestras	25
5.2 Extracción de ARN total	25
5.3 Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa	26
5.4 Secuenciación	28
5.5 Construcción y análisis filogenético	29
6. RESULTADOS	30
6.1 Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa	30
6.2 Análisis filogenético	31
7. DISCUSIÓN	33
8. CONCLUSIONES	39
9. PROSPECTIVA	40
REFERENCIAS	41
ANEXOS	48

RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un agente patógeno causante de la enfermedad denominada diarrea viral bovina (DVB) que afecta al ganado bovino de todo el mundo. Este virus se segrega en dos genotipos: el VDVB-1 y el VDVB-2. A su vez, estos genotipos se dividen en subgenotipos, siendo el VDVB-1b el más predominante en todo el mundo seguido del 1a y 1c. En México, la información sobre los genotipos y subgenotipos del VDVB circulantes en ganado bovino permanece escasa. La información disponible se reduce a la detección de los subgenotipos 1a, 1b, 1c y 2a en poblaciones bovinas pertenecientes a 6 regiones, siendo el subgenotipo 1c el que se detectó con mayor frecuencia. En contraste, en otro estudio realizado en bovinos de traspatio en Morelos únicamente se detectó el subgenotipo 1a. Por lo tanto, debido a la heterogeneidad y la diferencia en prevalencia de los subgenotipos del VDVB por región, es importante establecer la distribución de subgenotipos del VDVB endémicos en nuestro país.

En el presente trabajo se colectaron muestras de sueros provenientes de bovinos de dos municipios de la región de la Laguna, dicha región concentra el mayor inventario de bovinos productores de leche del país. Las muestras fueron analizadas por medio de RT-PCR y de 390 muestras totales se obtuvieron 47 muestras positivas al VDVB, lo que representa un 12.05% del total muestreado, estas muestras positivas fueron sometidas a secuenciación de las cuales se obtuvieron 14 secuencias que fueron utilizadas para el análisis filogenético y subsecuente construcción del árbol filogenético. De las muestras analizadas se observó una prevalencia del 71.43% para el VDVB-1a, 7.14% para cada uno de los subgenotipos 1b y 1c, y un 14.28% para el subgenotipo 2a. Por lo tanto, los hallazgos de este estudio demuestran que el VDVB es endémico en el ganado perteneciente a la región de la Laguna y refuerza que se requiere del establecimiento de medidas de bioseguridad adecuadas a la situación epidemiológica de la región. Así mismo, la información generada en este estudio complementa lo realizado en otros que tienen como objetivo establecer el estatus epidemiológico de la DVB a nivel nacional.

ABSTRACT

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a pathogen that causes the disease called bovine viral diarrhea (BVD), which affects cattle worldwide. This virus is segregated into two genotypes: BVDV-1 and BVDV-2. In turn, these genotypes are divided into subgenotypes, with BVDV-1b being the most predominant worldwide, followed by 1a and 1c. In Mexico, information on BVDV genotypes and subgenotypes circulating in cattle remains scarce. Available information is limited to the detection of subgenotypes 1a, 1b, 1c and 2a in cattle populations belonging to 6 regions, with subgenotype 1c being the most frequently detected. In contrast, in another study conducted in backyard cattle in Morelos, only subgenotype 1a was detected. Therefore, due to the heterogeneity and difference in prevalence of BVDV subgenotypes by region, it is important to establish the distribution of endemic BVDV subgenotypes in our country.

In the present study, serum samples were collected from cattle from two municipalities in the Laguna region, which has the largest inventory of milk-producing cattle in the country. The samples were analyzed by RT-PCR and out of 390 total samples, 47 BVDV positive samples were obtained, representing 12.05% of the total sampled. These positive samples were subjected to sequencing from which 14 sequences were obtained and used for phylogenetic analysis and subsequent construction of the phylogenetic tree. Of the samples analyzed, a prevalence of 71.43% was observed for BVDV-1a, 7.14% for each of the subgenotypes 1b and 1c, and 14.28% for subgenotype 2a. Therefore, the findings of this study demonstrate that BVDV is endemic in cattle belonging to the Laguna region and reinforce the need for the establishment of biosecurity measures appropriate to the epidemiological situation of the region. Likewise, the information generated in this study complements what has been done in other studies aimed at establishing the epidemiological status of BVDV at the national level.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un agente patógeno endémico del ganado bovino perteneciente al género *Pestivirus* dentro de la familia *Flaviviridae* (ICTV, 2023). Se conocen de forma clásica dos especies o dos genotipos, el VDVB-1 y el VDVB-2 (Yesilbag *et al*., 2017). En este mismo género podemos encontrar otros agentes patógenos como el virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) (Neill John, 2013). Asimismo, hay especies virales emergentes que recientemente se están clasificando en este género, tales como el pestivirus tipo *HoBi*, pestivirus de Bungowanna, pestivirus atípico porcino, entre otros, de los cuales se sabe que pueden infectar tanto animales domésticos como silvestres (Smith *et al*., 2017).

El VDVB se reportó por primera vez en 1946 por Olafson y colaboradores como un nuevo agente infeccioso que causaba una enfermedad gastroentérica que afectaba al ganado bovino en el estado de Nueva York. Los signos clínicos en el ganado eran leucopenia, depresión, fiebre, diarrea, deshidratación, anorexia, sialorrea, descarga nasal, hemorragias y erosiones gastrointestinales (Olafson *et al*., 1946). En la actualidad, el VDVB se ha posicionado como uno de los agentes infecciosos más importantes que afectan a los rumiantes en varias regiones del mundo. Su importancia radica en la capacidad de provocar una enfermedad clínica infecciosa en el ganado conocida como diarrea viral bovina (DVB), que puede tener diferentes manifestaciones clínicas en diferentes grados de gravedad. Dicha enfermedad es la causante de grandes pérdidas económicas a la industria ganadera, difíciles de estimar, y que están asociadas a una alta morbilidad (33-88%) y mortalidad (4-8%) (Ridpath *et al*., 2016), la disminución en la producción láctea en vacas productoras de leche, el sacrificio prematuro de los animales, abortos, malformaciones congénitas y las infecciones secundarias a las que predisponen la infección por el VDVB (Richter *et al*., 2017).

1.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

El VDVB es un virus envuelto pleomórfico que mide aproximadamente de 40-60 nm (Lindberg, 2003). La partícula viral está formada por una envoltura bilipídica externa rica en glicerofosfolípidos, esfingolípidos y colesterol que cubre la cápside, la cual contiene al genoma viral (Callens N. *et al*., 2016) (Figura 1). La envoltura lipídica le confiere sensibilidad al calor, a los detergentes y a los solventes orgánicos, agentes químicos que facilitan su inactivación (Neill, 2012). La cápside tiene una simetría icosaédrica con un diámetro de 25-37 nm aproximadamente (Murphy, 1999).

El VDVB tiene un genoma de ARN monocatenario en sentido positivo de 12,300 nucleótidos que contiene 2 regiones no traducibles cortas (5' UTR y 3' UTR, por sus siglas en inglés) que flanquean un marco de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) (Kokkonos *et al.,* 2020). El ORF se traduce en una sola poliproteína de aproximadamente 3900 aminoácidos (Newcomer, 2013) que posteriormente es escindida en proteínas individuales estructurales y no estructurales mediante proteasas celulares y virales (Mahony *et al*., 2005). El genoma está organizado de la siguiente forma: en el extremo 5' se encuentran los genes que codifican para la primera proteína no estructural N^{pro} así como los genes que codifican para las proteínas estructurales, que son la proteína de la cápside y las glicoproteínas E^{rns}, E1 y E2. Por otro lado, los siguientes dos tercios del ORF está constituido por los genes que codifican las proteínas no estructurales restantes (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Goens S. D., 2022) (Figura 1).

Las regiones denominadas 5'UTR y 3'UTR no codifican proteínas, se pliegan para formar estructuras secundarias que interactúan con las proteínas tanto virales como celulares y entre sí para regular la replicación y transcripción del ARN viral, así como la traducción del ORF (Neill, 2013). La región 5' UTR contiene un sitio de entrada ribosomal interno (IRES, por sus siglas en inglés) que es reconocido por proteínas de traducción celular que dirigen al ribosoma a unirse e iniciar la traducción de la poliproteína viral en el codón AUG correcto del ORF. El IRES está compuesto por tres hélices que contienen dos regiones muy variables (Burks *et al.,* 2011). La región

3'UTR contiene bucles de tallo conservados en lugar de la cola poli-A (Kokkonos *et al.,* 2020).

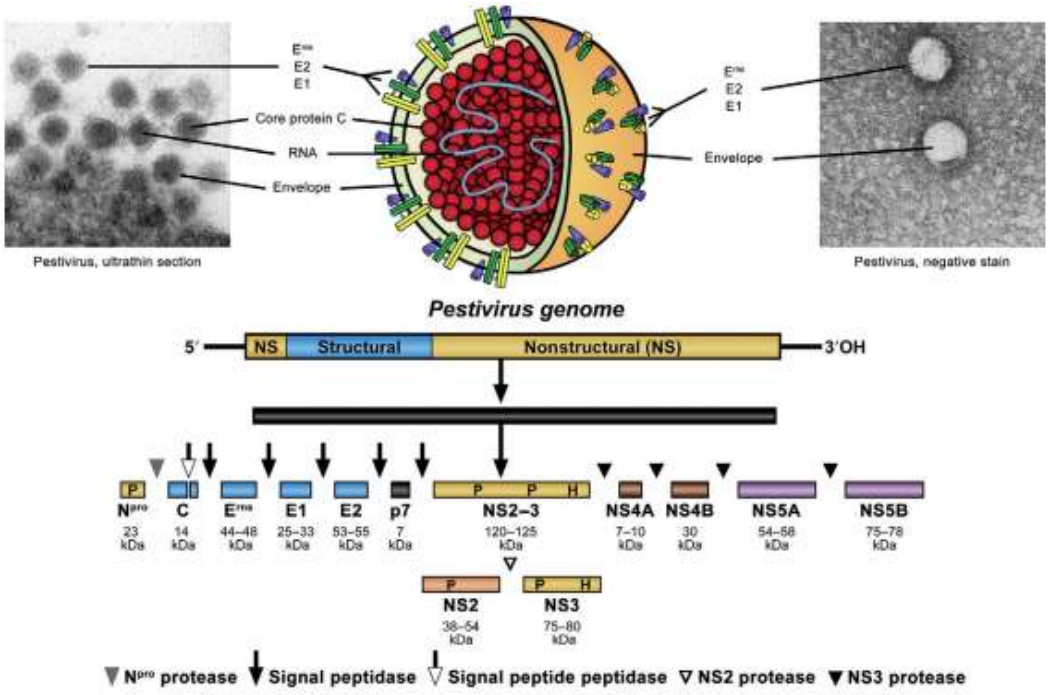

Figura 1. Características básicas de los *Pestivirus*. La figura muestra un esquema de la morfología de un *Pestivirus*, flanqueada por imágenes de microscopía electrónica (VDVB a la izquierda y VFPC a la derecha). Se muestra un esquema del genoma de los *Pestivirus*, con el marco de lectura abierto que codifica para la poliproteína, además se incluye el procesamiento de la poliproteína por las diferentes proteasas para obtener cada una de las proteínas virales. (Tautz *et al*. 2015)

1.3 GENOTIPOS Y SUBGENOTIPOS

Con base en el análisis del genoma del VDVB, este se divide en dos genotipos, el VDVB-1 y el VDVB-2. Ambos son actualmente reconocidos por el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV por sus siglas en inglés) como *Pestivirus A* y *Pestivirus B* respectivamente (Goens, 2022). Recientemente se han descrito un número creciente de nuevas especies de pestivirus tentativos relacionados con el VDVB que se han aislado de animales domésticos y silvestres. Algunos de estos son el virus Pronghorn aislado a partir de un antílope pronghorn en Estados Unidos, el virus de Bungowannah aislado a partir de cerdos en Australia y el Pestivirus

atípico *HoBi-Like* detectado en sueros y otras muestras de búfalos y bovinos (Yesilbag *et al*., 2017).

Los estudios filogenéticos del VDVB han generado la segregación de cada genotipo del virus en subgenotipos, en donde hay estudios que identifican 21 subgenotipos (1a-1u) para VDVB-1 y 4 subgenotipos (a-d) para VDVB-2 y el Pestivirus atípico HoBi-*like* (VDVB-3) (Gómez *et al.,* 2021).

Las variaciones genéticas y antigénicas entre los subgenotipos del VDVB pueden evaluarse mediante diferentes métodos como reacciones de anticuerpos monoclonales, pruebas de neutralización cruzada y comparación de secuencias de nucleótidos (Yesilbag *et al.* 2017). Los análisis filogenéticos de secuencias genómicas parciales o completas proporcionan información más detallada que los estudios basados en reacciones con anticuerpos y permiten la rápida detección de los subgenotipos del VDVB-1 y VDVB-2, así como la identificación de nuevas especies virales relacionadas con el VDVB (Ridpath *et al.*, 1994). Se han realizado estudios sobre genotipificación del VDVB utilizando diferentes regiones genómicas, como la 5'UTR, N^{pro} y E2 (Vilcek et al., 2005); sin embargo, las secuencias parciales o completas de la región 5' UTR son las más utilizadas para los análisis filogenéticos que determinan la genotipificación de aislamientos del VDVB, y esto permite la asignación de las cepas del VDVB en genotipos y subgenotipos (Yesilbag et al., 2017).

La variabilidad genética de los genomas de los pestivirus puede atribuirse a la acumulación de mutaciones puntuales resultantes de la actividad de la ARN-polimerasa dependiente de ARN propensa a errores y a la recombinación no homóloga y homóloga de ARN viral (Yesilbag *et al.,* 2017). Asumiendo que la tasa de mutación de los *Pestivirus* es similar a la informada para otros virus de ARN, se puede estimar que se introduce una mutación puntual en el genoma viral por ciclo de replicación (Tautz *et al.*, 2015). Para el VDVB-1 se han estimado diferentes tasas evolutivas, el análisis de las secuencias de la región 5' UTR revela una tasa evolutiva media de 9.3×10^3 sustituciones/sitio/año (Luzzago *et al.*, 2012). También hay estudios que confirman la tasa evolutiva del virus a partir del análisis de las

secuencias de las regiones de E1 y E2 en 1.26 X 10^3 sustituciones/sitio/año (Chernick *et al.*, 2014). Se ha descrito también que las recombinaciones de ARN del VDVB entre uno o más genotipos y subgenotipos son posibles, lo cual representa un desafío para los análisis filogenéticos y clasificación del virus.

En la tipificación genética inicial de los aislamientos del VDVB-1, sólo se reconocieron los subgenotipos 1a y 1b (Ridpath *et al.,* 1994); posteriormente, Vilcek y colaboradores, en 2001 describieron al menos 11 subgenotipos del mismo genotipo (Vilcek *et al.,* 2001), lo que muestra la diversidad considerable de este tipo de pestivirus y la importancia de continuar haciendo estudios de epidemiología molecular en la actualidad que permitan monitorear tanto genotipos como subgenotipos prevalentes al día de hoy.

1.4 BIOTIPOS

El VDVB se puede clasificar en dos biotipos con base en su efecto en cultivo celular, dividiéndose en cepas citopáticas (CP), aquellas que causan vacuolización y muerte de las células, y no citopáticas (NCP) refiriéndose a las cepas que tienen la capacidad de replicarse en el monoestrato celular sin generar cambios morfológicos o funcionales en el cultivo celular (Deregt y Loewen, 1995). Sin embargo, esta característica no influye en la virulencia del virus, e incluso, se sabe que las cepas con mayor virulencia pertenecen al biotipo NCP. Adicionalmente, el VDVB NCP tiene mayor distribución a nivel mundial (Pellerin *et al.,* 1994), cerca del 90-95% de los aislamientos de cepas del VDVB de campo son NCP y son las responsables de causar la mayoría de las presentaciones clínicas de la enfermedad incluyendo infección persistente (Dubovi, 1992).

Ambos biotipos tienen su principal diferencia a nivel molecular. Los VDVB CP tienen una proteína adicional que resulta de la escisión de la proteína NS2-3 en las proteínas NS2 y NS3, este cambio se asocia a cambios genotípicos puntuales bien caracterizados que por lo general ocurren en animales infectados con una cepa

NCP (Rajput *et al*., 2017). El evento mutacional más común asociado a estos cambios fenotípicos es la recombinación genética, en donde pequeñas secuencias de la célula hospedadora se insertan en el genoma del VDVB NCP, estas secuencias codifican para la ubiquitina permitiendo su escisión a nivel de la proteína NS2-3 (Peterhans *et al.,* 2010). Otros mecanismos que pueden explicar la expresión de la proteína NS3 en el VDVB CP son duplicaciones en la región NS3 e inserciones de nucleótidos en la región que codifica para la proteína NS2 (Bálint *et al*., 2005).

1.5 REPLICACIÓN

La replicación del VDVB comienza con la unión e interacción del virión con receptores específicos de la célula huésped, como el CD46 (Maurer *et al.,* 2004), glicoproteínas de la membrana celular como el heparán sulfato (Hulst *et al.,* 2001) y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR, por sus siglas en inglés) (Agnello *et al.,* 1999). Esta unión está dada por la interacción de las glicoproteínas virales, y se sabe que E^{rns} tiene el primer contacto con los glicosaminoglicanos de la superficie celular (Iqbal *et al.,* 2004) y E2 lo hace con las proteínas de membrana (Xue *et al.,* 1993) CD46 y LDLR.

Una vez que el virus se encuentra unido a la célula, continúa el proceso de internación mediante endocitosis mediada por clatrina, la envoltura viral se fusiona a la membrana del endosoma en un proceso dependiente de la disminución de pH endosomal y mediado por glicoproteínas virales (Lecot *et al.,* 2005). Ya que se completa la entrada a la célula huésped, el virus se desnuda con ayuda de enzimas celulares que remueven la cápside y el material genético es liberado al citoplasma (Sagar *et al*., 2008).

La traducción comienza cuando el IRES se une a la subunidad ribosomal 40S, posteriormente se formará el complejo 80S unido al codón de inicio AUG y se traduce la poliproteína que será escindida por proteasas virales y celulares para obtener las proteínas estructurales y no estructurales antes descritas (Liu *et al*.,

2019). La N^{pro} es la primera proteína escindida de la poliproteína, y es responsable de su propia liberación. De manera subsecuente, las proteínas C, E^{rns} E1, E2 y p7 son escindidas por actividad de proteasas celulares. Por el contrario, la escisión de las proteínas río abajo como NS2-3; NS4A, NS4B, NS5A y NS5B está dada por actividad proteasa de la NS3 (Elbers *et al*., 1996; Heimann *et al*., 2006).

Las proteínas no estructurales se ensamblan en un complejo de replicasa funcional para catalizar la transcripción de ARN de polaridad positiva a ARN de polaridad negativa que funcionará como molde para que el complejo de replicasa pueda seguir sintetizando moléculas adicionales de ARN en sentido positivo (Warrilow *et al.,* 2000). La replicación del material genético inicia con un complejo de replicasa de cadena positiva compuesto por componentes virales y celulares formados en el extremo 3' del genoma. La progresión desde la iniciación hasta la elongación ocurre después de la síntesis de ARN naciente de 8 a 10 nucleótidos de longitud (Sun y Kao, 1997).

Como parte del ensamblaje de nuevos viriones, la proteína de la cápside se une al ARN genómico viral en el retículo endoplásmico y su envoltura es adquirida a partir de membranas de vesículas citoplasmáticas y aparato de Golgi. Posteriormente, las partículas virales formadas son liberadas mediante exocitosis y pueden ser detectadas a las 8 horas post infección (Groomer *et al.,* 2001; Nutall, 1980).

1.6 PATOGENIA Y PATOGÉNESIS

El VDVB en cualquiera de sus dos genotipos tiene como hospedero natural al ganado bovino; sin embargo, se ha documentado que este virus es capaz de generar infecciones en diferentes especies tanto domésticas como silvestres, dentro de las cuales se incluyen ovinos, caprinos, cerdos, ciervos, búfalos, bisontes y alpacas, entre otros (Yesilbag *et al*., 2017).

La transmisión del VDVB se lleva a cabo de forma horizontal y vertical. En el primer caso, puede ser una transmisión horizontal directa, dada por el contacto entre un

animal persistentemente infectado (PI), del que se hablará en este mismo apartado, y un animal susceptible. Así mismo, los animales que cursan por un proceso de infección agudo de la enfermedad también pueden infectar a otros animales por transmisión horizontal. Esta vía suele ser menos eficiente debido a la baja concentración viral que eliminan los animales con este tipo de infección (Meyling *et al.*, 1990). Los animales susceptibles entran en contacto directo con secreciones corporales como descargas nasales, saliva, orina, heces, semen, leche y secreciones uterinas además de abortos, y se sabe que basta una hora de contacto para que se lleve a cabo la transmisión (Traven *et al.,*1991). Además, se ha reportado la transmisión a partir de semen contaminado utilizado en inseminación artificial y por la transferencia de embriones contaminados con el VDVB (Brock *et al.,* 1991).

La transmisión horizontal indirecta puede ser por el contacto de animales susceptibles con diferentes fómites, como agujas y jeringas reutilizadas, pinzas nasales, guantes de palpación o el uso de vacunas contaminadas (Houe, 1999).

La transmisión vertical se presenta cuando una hembra gestante susceptible es infectada con el VDVB, el cual, tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria e infectar al feto. El tipo de presentación clínica que desarrollará el producto se verá influenciado por el biotipo viral y la etapa de la gestación en la que ocurra la infección (Grooms, 2004).

El VDVB puede producir desde una infección subclínica, hasta causar diferentes manifestaciones clínicas, incluyendo las presentaciones reproductivas, digestivas, respiratorias, congénitas e infecciones persistentes (Deregt y Loewen, 1995). Diversos factores virales como la virulencia del virus, genotipo y biotipo, así como factores del hospedador como edad, estado fisiológico e inmunológico están involucrados en la presentación de la enfermedad y su gravedad.

A continuación, se describen los cuadros clínicos asociados a la infección por el VDVB.

- Infección subclínica.

  Se presenta en animales inmunocompetentes y se estima que cerca del 70 al 90% de las infecciones por el VDVB son de este tipo. Los animales pueden atravesar por cuadros de fiebre leves y leucopenia, posteriormente habrá una seroconversión al desarrollarse anticuerpos específicos contra el virus, y por lo tanto, esta presentación explica la alta prevalencia de ganado seropositivo al VDVB (Baker, 1995).

- Infección aguda.

  Cuando la infección por el VDVB se vuelve clínica, adquiere el nombre de DVB, es común que se presente en animales de 6 meses a 1 año de edad y tiene un periodo de incubación de 5 a 7 días (Baker, 1995). La viremia ocurre entre los 4 y los 10 días post infección; además, en este periodo el virus puede ser excretado en secreciones nasales y oculares (Brownlie *et al.*, 1987). El cuadro clínico en esta presentación se caracteriza por fiebre transitoria, leucopenia, anorexia, depresión, trastornos respiratorios, diarrea y aborto (Goto *et al.*, 2021).

- Infección en bovinos gestantes.

  El VDVB tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria y establecer una infección en el feto, puede generar diferentes alteraciones dependiendo la etapa de la gestación en la que afecte al producto. Durante los primeros 18 días de la gestación el VDVB no puede generar una infección en el embrión ya que no puede penetrar la zona pelúcida (Moennig y Liess, 1995). Una vez que se desarrollan los cotiledones, la viremia de la madre entre los días 29 y 41 después de la concepción, puede resultar en una infección embrionaria que podría conducir directamente a la muerte y reabsorción del embrión (Carlsson *et al.*, 1989).

  La infección en una vaca gestante con una cepa NCP del VDVB entre los días 25 y 120 de la gestación es la principal causa de animales

persistentemente infectados (PI) (Khodakaram y Farjanikish, 2017). A partir del día 150 de la gestación, la infección con el VDVB puede generar en el producto efectos teratogénicos, tales como atrofia cerebelosa, degeneración ocular, braquignatismo, formación de pseudoquistes en el cerebro y timo, hidrocefalia y retraso del crecimiento pulmonar, entre otros (Lanyon *et al.*, 2014).

- Infección persistente.

  Esta presentación de la enfermedad ocurre cuando una hembra gestante es infectada con una cepa NCP del VDVB dentro de los días 25 y 120 de la gestación; sin embargo, en ocasiones se puede encontrar una ventana de infección desde el día 18 hasta el 125 (Grooms, 2004).

  Las cepas NCP del virus tienen la capacidad de inhibir la producción de interferón I en el feto, lo cual permite que el virus permanezca en el producto sin ser detectado y eliminado y así establecer una infección persistente generando animales PI al nacimiento (Lanyon *et al.*, 2014). Estos animales tienen la capacidad de eliminar al virus durante toda su vida a través de secreciones como leche, saliva, semen, secreciones nasales, aerosoles, orina y heces, entre otras (Brownlie *et al.*, 1987), siendo así, la principal fuente de transmisión del virus hacia los animales susceptibles de un rebaño sano.

  Los animales PI pueden parecer clínicamente sanos; sin embargo, algunos pueden presentar un retraso en la tasa de crecimiento, por lo que son animales más pequeños y más débiles, representando una fuga económica para el productor (Baker, 1995).

- Enfermedad de las mucosas (EM).

  Es una presentación que sólo ocurre en el ganado PI y suele ser fatal. Se asocia a la coinfección de animales PI con una cepa CP homóloga o heteróloga del VDVB o puede generarse a causa de la mutación de la cepa NCP residente (Brownlie *et al.*. 1984; Sentsui *et al.*, 2001).

  El virus CP infecta los centros germinales de los ganglios linfáticos, las amígdalas y el tejido linfoide asociado al intestino (placas de Peyer) antes de propagarse al epitelio gastrointestinal, promueve la activación y diferenciación de monocitos, al mismo tiempo inhibe la presentación de antígenos a linfocitos T, esto conduce a un proceso inflamatorio descontrolado y debilitamiento del sistema inmunológico (Lanyon *et al.*, 2014). La proteasa NS3 de la cepa CP del VDVB induce la apoptosis de las células infectadas (Yamane *et al.*, 2006) principalmente en las placas de Peyer, generando atrofia del tejido linfoide. La infección genera necrosis de las células epiteliales del tracto digestivo provocando erosiones y ulceraciones sobre el mismo. Esto ocasiona el escape de líquido de la superficie lesionada del tubo digestivo y los animales presentarán entonces cuadros de diarreas y deshidratación, mientras que las infecciones bacterianas y la inflamación en los sitios expuestos provocarán septicemia secundaria que culminará con la muerte del animal (Lanyon *et al.*, 2014).

- Síndrome hemorrágico.

  Esta presentación clínica está asociada a una infección por un VDVB-2 biotipo NCP (Ridpath *et al.*, 2000) y se caracteriza por diarreas hemorrágicas, epistaxis, mucosas con hemorragias, sangrado constante en sitios de inyección, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte (Polak *et al.*, 2014).

1.7 DIAGNÓSTICO

El objetivo principal del diagnóstico de la DVB es la detección de los animales PI, ya que ellos representan la principal fuente de infección para los animales susceptibles (Houe, 1999). Para ello, se pueden utilizar una serie de pruebas diagnósticas encaminadas a detectar al antígeno viral; en contraste, la detección de anticuerpos específicos en estos animales no es posible debido a que el virus no es reconocido por su sistema inmunológico y no generan seroconversión. Para los animales que atravesaron por una infección subclínica o aguda sí será posible emplear pruebas serológicas para identificar a los animales positivos. A continuación, se enlistan algunas técnicas diagnósticas de elección para la detección de animales positivos a la DVB, tanto para la detección de antígeno como para la detección de anticuerpos.

- Aislamiento en cultivo celular.

El VDVB tiene la capacidad de replicarse en diferentes líneas celulares, como el cultivo de cornete bovino, el de testículo de toro o la línea de células de riñón de bovino *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK por sus siglas en inglés) (Edwards, 1990), en donde los virus pueden infectar a las células para replicarse y posteriormente lograr identificarlos.

Las muestras que se sugieren para realizar el aislamiento en casos de enfermedad aguda son sangre completa o la capa leucoplaquetaria, órganos linfoides como linfonodos, bazo y placas de Peyer. Otras muestras comunes como secreciones nasales, semen, leche u otros tejidos, pueden no ser óptimos para el diagnóstico de presentaciones agudas o subclínicas de la enfermedad debido a la presencia de anticuerpos neutralizantes producidos por el animal sospechoso y que podrían interferir con los resultados. Para los animales PI por la cantidad de virus que produce su organismo, prácticamente cualquier muestra podría ser adecuada para lograr el aislamiento (Saliki y Dubovi, 2004).

El periodo de incubación para el aislamiento del VDVB es en promedio de 4 a 5 días, y el crecimiento en el cultivo celular puede o no causar efectos citopáticos

dependiendo del biotipo de la cepa (Saliki y Dubovi, 2004). Para las cepas CP se tendrán que hacer revisiones diarias del cultivo celular con la finalidad de identificar algún cambio asociado a la replicación viral, como lo son la vacuolización y muerte celular (Deregt y Loewen, 1995). Para las cepas NCP se confirma el aislamiento con el uso de anticuerpos específicos marcados con un fluorocromo o con una enzima como la peroxidasa fijando el cultivo celular infectado (Sandvik, 1999).

- Pruebas moleculares (detección de ARN viral).

La detección de ARN viral se logra mediante el uso de la prueba de Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Esta prueba tiene la capacidad de detectar fragmentos de regiones del genoma del VDVB y que con su posterior análisis se pueden clasificar en los diferentes genotipos y subgenotipos existentes del virus (Ridpath y Bolin, 1998).

Para poder realizar el diagnóstico de DVB mediante RT-PCR se puede utilizar como muestra suero, leche, orina, tejidos, hisopados y capa leucoplaquetaria. Sin embargo, se debe de considerar la facilidad para extraer el ARN de cada una de las muestras para identificar correctamente al VDVB como parámetro para la elección del espécimen; así mismo, trabajar con controles internos para identificar resultados erróneos ocasionados por una mala preparación de la muestra (Saliki y Dubovi, 2004).

- Inmunohistoquímica (IHQ)

La inmunohistoquímica es una técnica de diagnóstico que consiste en identificar antígenos virales en una muestra de tejido fijada en formalina y embebida en parafina usando anticuerpos específicos marcados, que al unirse al antígeno generarán una tinción visible microscópicamente evidenciando el reconocimiento del antígeno viral (Brodersen, 2004).

- Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Es una prueba que se basa en el uso de anticuerpos específicos que se encargan de capturar a un antígeno viral. Para esta técnica se pueden usar como muestras partículas virales purificadas, extractos de cultivos celulares inoculados con el

VDVB, antígenos virales simples o proteínas virales recombinantes producidas en bacterias. Estas pruebas son utilizadas comúnmente en ganado PI ya que en animales con presentaciones agudas de la enfermedad suelen encontrarse falsos negativos por la cantidad de antígeno que producen (Saliki y Dubovi, 2004).

1.8 CONTROL Y PREVENCIÓN

La trazabilidad e identificación de animales positivos al VDVB se consideran medidas básicas de bioseguridad ya que la movilización de animales PI es una de las principales fuentes de propagación de la enfermedad; por lo tanto, con estas medidas se pueden establecen restricciones de movimiento de ganado (Larghi, 2018). Además del manejo que se emplea con la identificación y la eliminación de los animales PI, también se sabe que las instalaciones y el manejo de los animales en los hatos son sumamente importantes. En las producciones que cuentan con áreas bien determinadas y correctamente separadas se observa un retraso en la transmisión de la enfermedad (Houe, 1999).

Como se mencionó anteriormente, el ganado PI es clave para la transmisión del VDVB siendo la principal fuente de producción del virus. Por esta razón, los programas de control y prevención de la enfermedad tienen como objetivo su identificación mediante pruebas diagnósticas y posterior eliminación de estos animales (Larghi, 2018). Diferentes países, principalmente europeos, han implementado estrategias de control y erradicación. Por ejemplo, el modelo escandinavo, que también se implementó en Austria, se basa en la preselección de granjas con un mayor riesgo de la presencia de animales PI dentro de un hato, mediante el uso de detección de anticuerpos en leche a granel con una prueba de ELISA, con una estricta política de no vacunación. Posteriormente, se analizan los sueros de animales de producciones con una prevalencia mayor o igual al 60% para identificar animales PI y retirarlos, posteriormente se establece un seguimiento serológico continuo, con esto, se esperaría una erradicación de la enfermedad en un periodo aproximado de 10 años (Wernike et al., 2017).

En Alemania a partir del año 2011 se implementó un programa de erradicación nacional que se basa en evaluar a todos los terneros recién nacidos durante el primer mes de vida para detectar la presencia del antígeno y eliminar a todos los animales PI del hato para después mantener un diagnóstico serológico continuo (Wernike et al., 2017).

Otro país que ha implementado programas de control y erradicación de VDVB es Escocia. Empezaron su plan en 2010 con el objetivo de identificar y eliminar animales PI de los rebaños. Actualmente el programa cuenta con 5 fases. La primera fase consistió en una detección del virus en las poblaciones de bovinos nacionales subsidiada por el gobierno. Esta incluía pruebas diagnósticas y orientación veterinaria en caso de tener casos positivos. Con esta primera fase se encontró que el 23% de la población de ganado cárnico y el 52% del ganado productor de leche habían estado expuestos al virus. La fase dos incluyó el requisito de realizar evaluaciones anuales en las producciones por parte de los ganaderos, estos tenían que enviar muestras a laboratorios aprobados por el gobierno escocés quienes generaban los informes de los resultados. La tercera fase entró en vigor a principios de 2014 e incluía tres medidas de control con la finalidad de disminuir la propagación del virus. La primera era prohibir la venta o movilización de ganado con pruebas positivas a la enfermedad tanto para animales PI como animales con presentaciones agudas o subclínicas, la segunda medida era el requisito de declarar el estado de un rebaño antes de poder venderlo y la tercera era una restricción de rebaños no evaluados. La cuarta fase comenzó en junio de 2015 e implica la introducción de pruebas mejoradas y más restricciones de movilización. Por último, la fase 5 que busca especificar aún más cada uno de los requisitos para los productores y que el porcentaje de cumplimiento al programa de detección del VDVB sea mayor (Larghi, 2018).

Galicia fue la primera región en España que implementó programas de control para la DVB, en 2004 iniciaron con bases muy similares a lo descrito anteriormente, que es identificar animales PI en los rebaños y eliminarlos, además de mantener la aplicación periódica de pruebas diagnósticas para asegurar que una población

determinada está libre de la enfermedad. Sus evaluaciones se realizaban con pruebas serológicas semestrales en ganado mayor de un año utilizando muestras de leche a granel, y una vez que se detectaron títulos de anticuerpos altos se sospechaba de la presencia de animales PI en el rebaño, por lo que se iniciaba entonces una evaluación individual de todos los animales utilizando una prueba de ELISA que captura el antígeno de la proteína E^{rns} del VDVB (Factor *et al.*, 2016). Un inconveniente para este método era la vacunación, ya que los animales que eran vacunados producían títulos de anticuerpos que tenían que considerarse para la interpretación de resultados (Larghi, 2018).

La mayoría de los programas establecidos para el control y la erradicación de la DVB no consideran como una herramienta principal la vacunación; sin embargo, muchos países que no tienen estos programas utilizan las vacunas para tratar de controlar la transmisión de la enfermedad (Houe *et al.*, 2006).

Existen diferentes tipos de vacunas comerciales en el mundo, pueden ser vacunas de virus inactivado o de virus modificado o atenuado. Incluyen los genotipos 1 o 2, y se comercializan en presentación monovalente o multivalente. Su uso dependerá de las condiciones y características de la producción, además del tipo de manejo que se vaya a implementar. Las vacunas con virus inactivo contra la DVB pueden tener una efectividad variable debido a su baja inmunogenicidad que está directamente relacionada con su concentración antigénica (Fernández *et al.*, 2009). Se sabe también que debido a la poca diversidad de cepas que se emplean para su producción, la antigenicidad cruzada es muy limitada. Este tipo de vacunas por lo regular se combinan con otros patógenos reproductivos y respiratorios, por lo que la concentración de antígeno será más baja y puede conducir a una producción reducida de anticuerpos por parte del hospedero (Pecora *et al.*, 2015). Las vacunas activas son más utilizadas en comparación con las vacunas inactivadas y confieren una mayor protección inmunitaria del hospedero; sin embargo, existe un riesgo considerable de mutación, reactivación, recombinación y replicación del virus por lo que algunos países como Argentina no las utilizan para el control de la enfermedad (Larghi 2018).

Ambos tipos de vacunas han estado presentes en el mundo desde hace más de 50 años, sin muchas modificaciones. No obstante, la presentación de la enfermedad sigue siendo un problema para las producciones de ganado bovino, esto quiere decir que las vacunas también deberían tener actualizaciones constantes. La baja eficacia que la vacunación tiene para el control y la prevención de la enfermedad se debe a la heterogeneidad que existe entre las diferentes cepas virales que se encuentran en cambio constante (Antos *et al.*, 2021).

Las variaciones genéticas descritas para los genotipos 1 y 2 deben considerarse en el control de la enfermedad ya que los diagnósticos y las vacunas que funcionan contra cepas homólogas pueden ser menos eficaces para virus genéticamente distintos (Yesilbag et al., 2017).

1.9 EPIDEMIOLOGÍA

El VDVB es un agente etiológico presente en las producciones de ganado bovino en todo el mundo, la seroprevalencia del virus varía dependiendo la región, pero se estima que oscila entre el 40% y el 80% considerando los casos de enfermedad aguda. Por otro lado, la prevalencia de los animales PI se encuentra entre el 0.5% y el 4%, sin embargo, estos datos requieren un mejor soporte estadístico a nivel mundial ya que existen regiones que no realizan el diagnóstico de la enfermedad y por lo tanto tampoco se tiene el conocimiento de la prevalencia de animales PI (Quintero *et al.,* 2019). Estos datos podemos considerarlos como prevalencia y seroprevalencia aparentes, ya que solo se considera una presentación de la enfermedad (enfermedad aguda y PI) por lo que a nivel mundial podemos inferir que los valores de prevalencia y seroprevalencia real siguen siendo inciertos en diferentes partes del mundo.

Un estudio realizado en 2018 por Scharnböck y colaboradores, determinó la prevalencia del VDVB analizando diferentes reportes, sumando así la información de 6,5 millones de animales de 310 548 rebaños desde 1961 hasta 2016. Se identificó en el análisis que la prevalencia de los animales con infecciones

persistentes era variable en todo el mundo, calculada como baja prevalencia (<0.8%) en países de Europa, América del Norte y Australia, una prevalencia media (0.8%-1.6%) en países del este de Asia, y una prevalencia alta (>1.6%) en el oeste de Asia. Encontraron que la prevalencia de animales con infecciones persistentes disminuye con el paso del tiempo en los países de Europa, probablemente por la implementación de programas de control y erradicación de la enfermedad. Con relación a la seroprevalencia, en el mismo estudio se determinó que mantenía valores relativamente constantes durante el periodo de estudio, encontrando valores que van de 48.73% a 46.23%. Sin embargo, se observa un ligero incremento en la seroprevalencia de América del Norte y una disminución en países europeos. El estudio concluye que con base en los datos analizados es necesario establecer más estudios epidemiológicos estandarizados para que las autoridades sanitarias encargadas del control de enfermedades puedan establecer mejores medidas para la prevención, control y erradicación de la enfermedad (Scharnböck *et al.*, 2018).

También se puede considerar la distribución mundial de los genotipos y subgenotipos reportados del virus para entender su distribución y evolución. Hay estudios que indican que ciertos subgenotipos del VDVB predominan en diferentes países, en los cuales no sólo se ha detectado el virus en ganado bovino, sino que también hay aislamientos reportados en otros rumiantes como ovejas, cabras, yaks, búfalos, llamas, alpacas, camellos y ciervos (Becher *et al.*, 1999).

Otro estudio realizado por Yesilbag y colaboradores analizan la recopilación de secuencias del VDVB depositados en bases de datos, en donde el VDVB-1b es el subgenotipo predominante a nivel mundial seguido de VDVB-1a y VDVB-1c. Considerando a cada continente de forma individual se sabe que el VDVB-1b es el subgenotipo predominante en América, Asia y Europa. En Australia, más del 95% de los aislados reportados corresponden al VDVB-1c, mientras que para África no hay información suficiente que ayude a determinar el subgenotipo predominante. En cambio, en Sudáfrica se determina que VDVB-1a se ha detectado con mayor frecuencia que otros subgenotipos del virus (Yesilbag et al., 2017).

El VDVB-2 se identificó por primera vez en Canadá y Estados Unidos; sin embargo, actualmente se sabe que la distribución de este genotipo incluye países europeos como Alemania, Bélgica, Francia, Reino Unido, Eslovaquia y Austria (Yesilbag et al., 2017). Hay estudios que revelan que el VDVB-2a es el subgenotipo con mayor prevalencia en todos los continentes, mientras que el VDVB-2c se ha detectado en países de América y Europa y el VDVB-2d sólo se ha aislado en Argentina (Giangaspero *et al.*, 2008).

1.10 SITUACIÓN DEL VDVB EN MÉXICO

Actualmente, los informes oficiales y los estudios científicos sobre la DVB en México son limitados. La DVB está clasificada dentro del grupo 3 referenciado en el Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos como una enfermedad endémica y de distribución nacional. La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) y las autoridades nacionales estipulan que “los contagios de DVB son de riesgo menor ya que pueden ser controlados con buenas prácticas ganaderas y notificaciones mensuales obligatorias al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVE)” (ACUERDO). Por tal motivo, no existe algún programa nacional de control y erradicación de la enfermedad obligatorio y todos los manejos preventivos son voluntarios y establecidos con base en el conocimiento que los manejadores de ganado tengan sobre la DVB. En cuanto al diagnóstico se considera al Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Sanidad Animal (CENASA) como laboratorio de referencia a cargo del diagnóstico de la DVB y los ensayos que se implementan para la detección del VDVB son el aislamiento viral, RT-PCR en tiempo real, ELISA y neutralización viral (Gómez-Romero *et al.*, 2021).

El manejo de la vacunación en México tiene como principal objetivo disminuir la incidencia de trastornos respiratorios y reproductivos. Es común encontrar vacunas múltiples en combinación con otros antígenos para la prevención del complejo respiratorio bovino. Además, las vacunas son formuladas principalmente con virus

activos modificados utilizando cepas de referencia norteamericanas; por lo tanto, no hay una prevención específica contra cepas del virus circulantes en el país. También, se sabe que la aplicación de estas vacunas puede representar un riesgo para hembras gestantes por todas las complicaciones que esto implicaría sobre la posible generación de animales PI (Gómez-Romero *et al.*, 2021).

Hay pocos estudios que evalúan la prevalencia de la DVB en México, el primero de ellos se basó en la identificación de anticuerpos neutralizantes contra VDVB en 47 animales no vacunados con historia clínica de abortos, infertilidad y signos respiratorios, en el cual se determinó una seropositividad del 75% (Correa *et al.*, 1975). Posteriormente, Suzan y colaboradores describieron una seroprevalencia del 70.5% en ganado lechero de dos estados de la república y del 62.5% en ganado de carne de 10 estados como evidencia serológica de infección por VDVB en ganado sano (Suzan *et al.*, 1983).

En otros estudios de seroprevalencia del VDVB se evidencia que una proporción sustancial de la población de ganado bovino en México ha estado expuesta al virus, ya sea por exposición natural o por vacunación; sin embargo, no hay una interpretación correcta de estos resultados que nos ayuden a identificar cual es la historia natural de la exposición de los animales a cepas virales de campo. Por otra parte, en los estudios de prevalencia de anticuerpos contra la enfermedad no se considera a los animales PI, los cuales sólo tienen la capacidad de generar anticuerpos contra cepas heterólogas a la cepa original que causa la inmunotolerancia (Gómez-Romero *et al.*, 2021). Con esta información se puede considerar que los datos relacionados a la seroprevalencia del VDVB en México están subestimados y se requieren metodologías más específicas que nos ayuden a identificar el comportamiento y la distribución del virus en el país.

Como se mencionó anteriormente, la información relacionada a la diversidad genética del VDVB en México es escasa. Un estudio reciente realizado por Gómez-Romero y colaboradores, identificó 4 subgenotipos del VDVB en ganado de 6 estados de la república: VDVB-1a, 1b, 1c y VDVB-2a; siendo el subgenotipo 1c el que tuvo una mayor frecuencia de identificación, seguido de los subgenotipos 1b,

1a y 2a (Gómez-Romero *et al.*, 2017). No obstante, se requiere más información para poder establecer el estado epidemiológico nacional, esto ayudaría a conocer mejor la enfermedad y poder establecer mejores manejos de control y prevención.

2. JUSTIFICACIÓN

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un agente patógeno endémico de las poblaciones de ganado bovino en todo el mundo que puede tener diversas presentaciones clínicas de gravedad variable. Debido a lo anterior, genera pérdidas económicas significativas a la industria ganadera.

La información sobre la caracterización genética de los genotipos y subgenotipos del VDVB prevalentes que circulan en la población ganadera nacional continua siendo escasa.

La cuenca lechera de la comarca lagunera en México, es una región que concentra la mayor parte del inventario bovino de leche; no obstante, no hay estudios previos que determinen los genotipos y subgenotipos del VDVB predominantes en la región.

3. HIPÓTESIS

El VDVB se encuentra circulando en poblaciones bovinas pertenecientes a la cuenca lechera de la Laguna, México.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo general

Genotipificar las muestras positivas al VDVB por RT-PCR y secuenciación obtenidas a partir de suero de bovinos para determinar los patrones filogenéticos de la región 5' no traducible (5' UTR) del VDVB por medio de herramientas bioinformáticas, con la finalidad de determinar la prevalencia de genotipos del virus que circulan en la región de la Laguna, México.

4.2 Objetivos particulares

- Detectar el genoma del virus de diarrea viral bovina en muestras de suero de bovinos provenientes de la cuenca lechera de la Laguna, México.
- Obtener la secuencia de la región 5' UTR de cada una de las muestras positivas al VDVB.
- Determinar los genotipos del VDVB circulantes en la región de la Laguna, México y su relación con otros genotipos previamente reportados en diferentes países.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Toma de muestras

Se realizó un muestreo aleatorio en tres explotaciones diferentes de la región conocida como cuenca lechera de la Laguna, México como se observa en la tabla 1. Se obtuvieron un total de 390 muestras de suero. El número de muestras fue establecido con base a las posibilidades de acceder a las producciones de la región así como por el número de animales disponibles en las mismas.

Producción	Lugar	No. de muestras
1	Gómez Palacio, Durango	100
2	Matamoros, Coahuila	200
3	Matamoros, Coahuila	90

Tabla 1. Producciones muestreadas con su locación correspondiente de las cuales se obtuvo un total de 390 muestras de sueros.

Las muestras fueron tomadas por punción de la vena coccígea y recolectadas en tubos Vacutainer® sin anticoagulante (tapón rojo) para obtener suero de cada uno de los animales. Después fueron transportadas en hieleras a 4°C hasta su procesamiento y conservación a -70°C.

Para obtener el suero a partir de muestras sin anticoagulante, estas se centrifugaron a 3,000 rpm por 5 min, para posteriormente con una micropipeta separar el suero del coágulo y realizar alícuotas de 1.5 ml aproximadamente en tubos de 2 ml. Finalmente, las alícuotas se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

5.2 Extracción de ARN total

Se realizó la extracción de ARN total utilizando TRIzol® reagent (Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se colocaron en tubos estériles de 2 ml, 900 microlitros de TRIzol® reagent con 400 microlitros de suero,

se homogeneizó en vortex y se incubó por 5 min en hielo (4°C). Posteriormente se adicionaron 240 microlitros de cloroformo a -20°C, se homogeneizó manualmente por 15 segundos y se incubó a 4°C por 15 minutos. Terminando la incubación se realizó una centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4°C, la muestra se separó en tres fases, la fase superior se transfirió a un tubo de 1.5 ml estéril y se adicionaron 600 microlitros de isopropanol a -20°C, se homogeniza suavemente invirtiendo el tubo y se incubó por una hora a -20°C para permitir la precipitación del ARN. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol con DEPC al 75%, se realizó una última centrifugación a 14,000 rpm por 15 min a 4°C y posteriormente el sobrenadante se decantó para secar el botón de ARN. La muestra se resuspendió con 20 microlitros de agua tratada con DEPC.

La cuantificación del ARN total se realizó mediante espectrofotometría en Nanodrop utilizando 1 microlitro de muestra y posteriormente fue almacenado a -70°C hasta su uso.

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

Se realizó Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) utilizando el ARN de cada una de las muestras de suero para amplificar un fragmento de la región 5’ UTR utilizando los iniciadores mencionados en la tabla 2.

Para la RT-PCR, utilizando los iniciadores anteriormente mencionados, se utilizaron los reactivos y concentraciones indicados en la tabla 3.

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

Tabla 2. Juegos de iniciadores reportados utilizados para las reacciones de RT-PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
dNTP's	10 mM	200 µM
M-MLV (Invitrogen)	200U/µl	50 U
Iniciador sentido	20 µM	0.2 µM
Iniciador antisentido	20 µM	0.2 µM
Taq polimerasa (Roche)	5 U/µl	2.5 U/reacción
Inhibidor de RNAsas (Promega)	40 U/µl	20 U
Agua		c.b.p. 100 µl
Volumen final		100 µl

Tabla 3. Reactivos y concentraciones utilizados para la RT-PCR.

Una vez realizadas las mezclas de reacción, fueron sometidas al termociclador bajo las siguientes condiciones:

VIL 324/326	HCV 90/368	5' UTR START
Desnaturalización		
56°C – 1 hora	56°C – 1 hora	56°C – 1 hora
94°C – 2 min	94°C – 4 min	94°C – 4 min
Alineamiento		
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
Extensión		
72°C – 7 min	72°C – 10 min	72°C – 10 min

Tabla 4. Condiciones de tiempo y temperatura a las cuales fueron sometidas las muestras con cada uno de los iniciadores reportados.

Los productos de PCR fueron observados en gel de agarosa al 1% en TAE teñido con *GelRed Nucleid Acid®*.

5.4 Secuenciación

Posteriormente, las bandas del producto de PCR observadas fueron purificadas utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction®* bajo las indicaciones del fabricante y fueron enviadas al Instituto de Biotecnología de la UNAM para ser secuenciadas.

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

5.5 Construcción y análisis filogenético

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron alineadas utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), utilizando el software Bioedit (Hall, 1999). El análisis filogenético se llevó a cabo usando el software MEGA 7 (Tamura *et al.*, 2013), para el cual se consideraron los siguientes parámetros: Como modelo de sustitución nucleotídica se utilizó el método Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980), dicho modelo se eligió con base en el valor obtenido por el criterio de información bayesiana. Finalmente, se utilizó el método de Máxima Verosimilitud como método de reconstrucción filogenética (Guindon y Gascuel, 2003), y se utilizaron 500 réplicas de *boostraps* de soporte estadístico (Felsenstein, 1985). Con la finalidad de conocer la relación filogenética de las cepas encontradas en el estudio con otras secuencias de referencia del VDVB previamente publicados en otros países, se realizó una reconstrucción filogenética con secuencias procedentes del *GenBank*.

6. RESULTADOS

6.1 Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

De 390 muestras totales, se obtuvieron 47 muestras positivas al VDVB mediante la técnica de RT-PCR con los iniciadores 5'UTR/START y VIL 324/326, esto se traduce en una frecuencia de 12.05%. En contraste, con el iniciador HCV 90/368 no se logró identificar ninguna muestra positiva. En el anexo 1 se muestra la identificación de los animales positivos al VDVB mediante RT-PCR.

Los resultados obtenidos en la RT-PCR se resumen en la siguiente tabla:

Iniciador	VIL 324/326	5' UTR/START	HCV 90/368	Total
Producción 1	7	13	0	20
Producción 2	7	3	0	10
Producción 3	13	4	0	17

Tabla 5. Muestras positivas a la RT-PCR con cada iniciador utilizado.

Del total de las muestras de suero positivas al VDVB utilizando RT-PCR, únicamente se obtuvo la secuencia de nucleótidos de un fragmento de la región 5'UTR de 14 muestras. Lo anterior, debido a que no se obtuvo la calidad y concentración necesaria del producto de PCR para llevar a cabo la secuenciación.

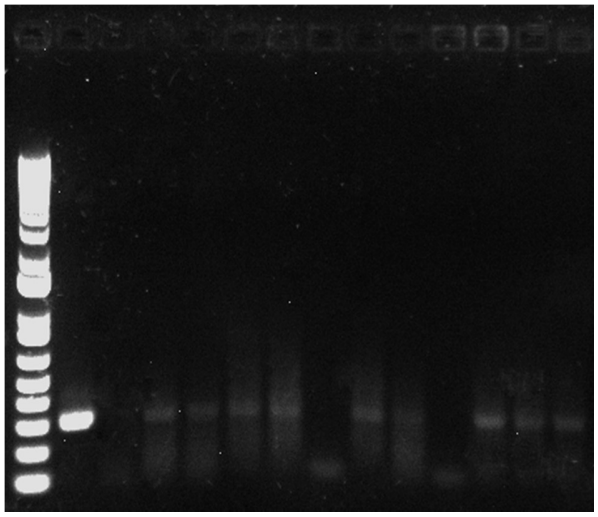

Figura 2. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con GelRed®, donde se muestra la amplificación de la región 5'UTR del vDVB. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb Plus, carril 2: testigo positivo (VDVB cepa NADL) carril 3: testigo negativo (células MDBK), carril 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13 y 14: muestras positivas al VDVB.

6.2 Análisis filogenético

El análisis filogenético se llevó a cabo utilizando las secuencias de las muestras positivas al VDVB y secuencias de cepas de referencia reportadas en el *GenBank*, con base en un fragmento de la región 5'UTR.

En la reconstrucción filogenética se muestra la segregación de los genotipos del VDVB en 3 clados principales identificados como VDVB-1, VDVB-2 y HoBi-*like.* El VDVB-1 está subdividido en 3 subclados identificados como VDVB-1a, 1b y 1c. Del total de las muestras el 71.43% se clasificaron dentro del subgenotipo VDVB-1a, mientras que el 7.14% se agrupó en el subgenotipo 1b y 7.14% en el 1c. El 14.28% se clasificó como VDVB-2a. Ninguna de las muestras se agrupó en el clado de los VDVB-2b, VDVB-2c y HoBi-*like.*

En el árbol se señalan con una flecha las muestras de suero positivas al VDVB identificadas en el presente trabajo, en comparación con secuencias de referencia reportadas obtenidas del *GenBank,* y cuyo número de acceso se encuentra a un costado de la identificación (Figura 3).

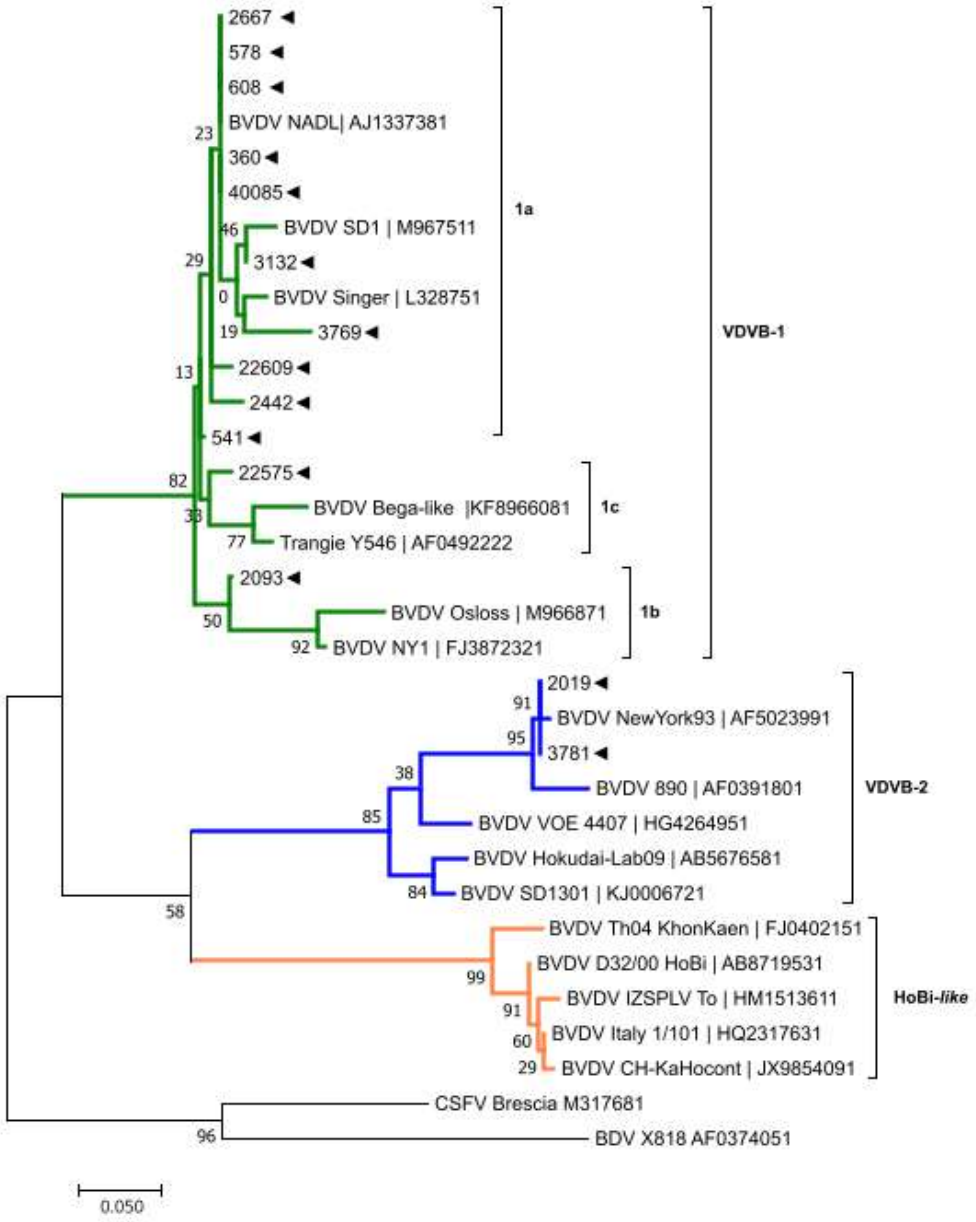

Figura 3. Análisis filogenético del VDVB con base en la región 5'UTR. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud utilizando un fragmento de 275 nucleótidos contenido en la región 5'UTR. Se utilizaron las secuencias obtenidas en este trabajo (señaladas con una flecha negra) y cepas 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 *bootstrap.*

7. DISCUSIÓN

La DVB es una enfermedad que genera pérdidas significativas al sector ganadero que se estiman en hasta 46 millones de dólares por año. Sin embargo, este cálculo no incluye efectos indirectos de la infección por el VDVB como la inmunosupresión, y por consiguiente, la predisposición a infecciones por agentes patógenos oportunistas; por lo tanto, dicha estimación puede incrementarse (Houe, 2003).

Con base en lo anterior, diversos países llevan a cabo la identificación y caracterización genética de los VDVB detectados en sus poblaciones de rumiantes con la finalidad de utilizar esta información al implementar programas de control y prevención de la DVB. Actualmente en México la información sobre caracterización de genotipos y subgenotipos que afectan a la industria ganadera nacional continúa siendo escasa. La DVB es considerada una enfermedad endémica de la población bovina con distribución nacional y de reporte obligatorio (Acuerdo) por la SADER. Sin embargo, no se han establecido programas de control o erradicación oficiales, por lo que el control de la DVB se basa en actividades voluntarias con base en el conocimiento que los productores ganaderos tengan sobre la DVB. Como consecuencia de lo anterior, las estrategias de prevención y control de la DVB son variables entre hatos y en consecuencia la prevalencia del VDVB varía entre poblaciones animales nacionales.

Inicialmente la identificación de la DVB en México se basó en la detección de anticuerpos contra el VDVB para determinar la seroprevalencia. En un estudio realizado en animales no vacunados con problemas reproductivos respiratorios se reportó una seroprevalencia del 75% (Correa-Girón et al., 1975). Asimismo, en un estudio realizado por Suzan et al., (1983) se evidenció la infección por VDVB en animales clínicamente sanos al describir una seroprevalencia del 70.5% en animales de Hidalgo y Morelos, mientras que en bovinos de engorda provenientes de Veracruz, Sonora, Durango, Baja California, Guerrero, Yucatán, San Luis Potosí, Jalisco, Coahuila y Chihuahua se estimó una seroprevalencia del 62.5%. En contraste, un menor porcentaje de seroprevalencia (14%) fue detectado en bovinos

no vacunados en Yucatán; en donde a pesar de ser un nivel bajo de seroprevalencia, este evidencia la exposición natural que tuvieron los animales al VDVB (Solís-Calderón et al., 2005).

De manera subsecuente, se realizaron estudios que estimaron una seroprevalencia entre 74-82.27% en bovinos domésticos distribuidos en diversos estados de México. De igual forma, se ha detectado la presencia de anticuerpos contra el VDVB en poblaciones de cabras y venados cola blanca, en donde se ha estimado una seroprevalencia del 20 y 63.52% en promedio respectivamente (Suzan et al., 1983; Cantú et al., 2008).

Los resultados serológicos de estudios previos demuestran que el ganado mexicano ha estado expuesto al VDVB; sin embargo, existe información limitada sobre la diversidad genética del VDVB en la población bovina de México, por lo que el estatus epidemiológico de la DVB solo es parcialmente conocido. No obstante, es importante considerar que la diversidad genética, inherente a las cepas del VDVB, promueve un escenario en constante cambio en términos de la prevalencia de los subgenotipos

En la actualidad se sabe que a nivel mundial el VDVB-1 es el genotipo con mayor distribución, además de ser también la variante con más subgenotipos reportada. El VDVB-1b es el subgenotipo predominante en el mundo seguido de los subgenotipos 1a y 1c. Con relación al genotipo 2, cabe mencionar que el subgenotipo 2a es el que presenta la mayor prevalencia en el mundo y los subgenotipos 2b, 2c y 2d sólo se han identificado en algunos países de Europa y Asia (Yesilbag *et al.*, 2017). La información que tenemos en México es muy limitada, ya que hay pocos estudios que tienen como objetivo establecer un patrón de distribución del VDVB con base en estudios filogenéticos. En un estudio en donde se hicieron muestreos de seis estados de México se identificó que el VDVB-1c fue el subgenotipo identificado con mayor frecuencia seguido de 1b, 1a y 2a sin encontrar evidencia de virus HoBi-*like*.(Gómez-Romero *et al.*, 2017). En 2022, Basurto-Alcántara *et al* realizaron la detección del VDVB-1a como el VDVB

predominante en muestras procedentes de producciones de traspatio en el municipio de Tepalcingo, Morelos, (Basurto-Alcántara *et al.*, 2022).

Así mismo, a inicios de 2023 como parte de un reporte de caso se describió la detección del VDVB-1b en un bovino de dos años, sugerente como PI, que desarrolló la presentación clínica conocida como enfermedad de las mucosas (Navarro-López et al. 2023). Adicionalmente, se ha realizado la detección y aislamiento del VDVB-1b a partir de muestras de búfalos y un gamo en cautiverio, provenientes de diversas regiones en México (Medina-Gudiño et al., 2022).

La vigilancia epidemiológica y el monitoreo de variantes del VDVB que circulan en bovinos nacionales es crucial para establecer el estatus epidemiológico de la DVB a nivel regional y nacional. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar la genotipificación de los VDVB detectados en unidades de producción localizadas en la región de La Laguna en donde se concentra el mayor inventario de bovinos lecheros a nivel nacional. La información obtenida será útil para establecer programas de identificación, control y prevención de la enfermedad adecuados a la situación actual regional y por lo tanto, disminuir las pérdidas monetarias que representa.

En México la DVB se cataloga como una enfermedad endémica por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) y consideran que con base en lo publicado el 29 de noviembre del 2018 en el Diario Oficial de la Federación, es una enfermedad del grupo 3, en donde se encuentran las enfermedades y plagas endémicas “y que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y para el comercio nacional e internacional, ya que pueden ser controlables a través de las buenas prácticas pecuarias o acuícolas y deben de ser de notificación mensual obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica” por lo que no existe ningún programa de identificación, control, prevención y erradicación de la enfermedad. Sin embargo, en países europeos como Noruega, Suecia, Dinamarca, Alemania, Finlandia, entre otros, sí cuentan con estos programas y se ha demostrado que hay una disminución

en la prevalencia del VDVB así como en las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad (Evans *et al.*, 2019).

Hasta el 2021 se tiene en México un censo de casi 2.7 millones de cabezas de ganado bovino especializado en producción de leche, de las cuales, cerca de 523 mil cabezas se encuentran en la región de la comarca lagunera. Dicha región está constituida por 5 municipios de Coahuila (Torreón, Matamoros, San Pedro de las Colonias, Francisco I. Madero y Viesca) y 11 municipios de Durango (Gómez Palacio, Lerdo, Tlahualilo de Zaragoza, Mapimí, San Pedro del Gallo, San Luis Cordero, Rodeo, Nazas, Cuencamé de Ceniceros, General Simón Bolívar y San Juan de Guadalupe) en donde en promedio se producen alrededor de 1.3 mil millones de litros de leche al año, convirtiéndola en una de las principales regiones productoras de leche del país (de la Cruz Torres, 2021). Para tener este promedio de producción es necesario mantener el número de cabezas de la población de ganado bovino, esto se logra dentro de una producción generando sus propios reemplazos o importando pie de cría o semen para inseminación. Los principales países de donde se puede obtener pie de cría de ganado bovino lechero para México son Estados Unidos de América, Canadá y Australia, mientras que para el semen de bovino se pueden identificar como países importadores a México principalmente a Estados Unidos de América, Canadá, Francia, España y Dinamarca (datamexico.org). Conociendo la distribución del VDVB en el mundo sabemos que la mayoría de los países mencionados como importadores para México tienen al VDVB como agente etiológico endémico, por lo tanto, sería factible introducir la enfermedad por estas vías si no se tienen las medidas zoosanitarias correspondientes.

Por otro lado, la mayoría de las producciones que se encuentran en esta región del país son de tipo intensivo altamente tecnificadas, en donde aplican esquemas de vacunación a todos o a la mayoría de los animales. Con relación a esto, hay estudios que demuestran que es común encontrar al VDVB como un contaminante en vacunas comerciales o productos biológicos que se usan para fabricar las mismas

(Gómez-Romero *et al.*, 2021), por lo que podría ser esta otra fuente de ingreso del virus hacia las poblaciones bovinas de esta región.

En el presente trabajo encontramos una mayor frecuencia del subgenotipo 1a, seguida de 1b y 1c, además de identificar dos muestras clasificadas como VDVB-2a. En contraste con los otros estudios reportados, observamos similitud con el estudio reportado por Basurto-Alcántara y colaboradores teniendo al mismo subgenotipo predominante.

La prevalencia del subgenotipo 1a que se obtuvo podría estar asociada a la ausencia de vacunación o a la presencia de animales PI infectados con VDVB subgenotipo 1a, ya que en diferentes regiones de México las vacunas comerciales utilizan cepas de virus activos modificados como la cepa NADL. Por lo que esta herramienta de control sería eficaz para contener infecciones causadas por VDVB subgenotipo 1a. Otro aspecto que hay que considerar es la protección que confieren los productos vacunales comerciales utilizados ante infecciones de campo.

El VDVB-2 está presente en América y es el subgenotipo 2a el más predominante (Yesilbag *et al.*, 2017), por lo que es factible encontrarlo en México como parte de la diversidad genética del VDVB, además de que en otros estudios de filogenia en México ya ha sido identificado (Gómez *et al.*, 2017; Basurto-Alcántara *et al.*, 2022).

En México no existe una normativa obligatoria para reportar los casos positivos de DVB y la información epidemiológica sobre la enfermedad es escasa, por lo que podemos inferir que es un problema subdiagnosticado (Basurto-Alcántara *et al.*, 2022). Es probable que la poca importancia que se le da al VDVB se deba al desconocimiento de las diversas presentaciones clínicas que puede generar, así como las complicaciones con otros agentes etiológicos al que se asocia la enfermedad. Hay referencias en donde se reportan las manifestaciones clínicas que se pueden presentar, un ejemplo es un estudio realizado por da Silva y colaboradores en el 2020 en donde recopilan información de 6 brotes asociados al VDVB subgenotipos 1a y 2b en Uruguay, en los cuales se identificó la presentación de la enfermedad de las mucosas asociada a un VDVB-1a; además de abortos, infecciones agudas y transitorias ocasionadas por ambos subgenotipos.

Adicionalmente, identificaron coinfecciones con otros agentes patógenos como *Neospora caninum, Salmonella enterica* serotipo *typhimurium, Histophilus somni, Streptococcus sp., E. coli* y *Eimeria sp.* (da Silva *et al.,* 2020).

Establecer la distribución genética del VDVB en México es importante para poder establecer programas de control y prevención de la enfermedad, ya que como se mencionó anteriormente, la presentación clínica de la DVB implica pérdidas económicas significativas a la industria ganadera en el país. A pesar de que actualmente hablamos de una enfermedad a la que no se le ha dado la importancia necesaria, no podemos dejar de lado lo que ocurre en países como Alemania, Irlanda, Escocia, Holanda, entre otros, en donde el establecimiento de programas de control y erradicación han dado resultados positivos de disminución la incidencia de la enfermedad así como las complicaciones clínicas y pérdidas monetarias asociadas a la misma.

Por otro lado, el diseño de las vacunas para prevenir la enfermedad debería estar basado en el uso de subgenotipos prevalentes en el país; por lo tanto, generar estos estudios podrían contribuir al diseño de inmunógenos que induzcan protección contra los subgenotipos circulantes, y promover una mejor eficacia contra la DVB. Adicionalmente, la realización de este tipo de estudios resalta la necesidad de conocer no solo los productos comerciales que se aplican en el país, sino también conocer la metodología correcta de uso que promueva su efectividad e inocuidad en ganado susceptible y ganado gestante.

8. CONCLUSIONES

- Se detectó ARN viral del VDVB en el 12% de las muestras de suero analizadas mediante técnicas moleculares de RT-PCR y secuenciación.
- Con base en el análisis filogenético se identificó al VDVB 1a como el subgenotipo predominante en la población analizada, seguido del VDVB 1b y 1c, además de identificar también al VDVB 2a en dos de las muestras analizadas.

9. PROSPECTIVA

- Establecer un muestreo que incluya más municipios de la región y la subsecuente identificación de subgenotipos del VDVB para conocer su situación epidemiológica.
- Determinar el impacto económico que representa la presentación de la DVB para las diferentes regiones ganaderas del país.
- Establecer un programa de diagnóstico enfocado a la identificación de animales PI para su posterior eliminación como parte de un programa de control de la enfermedad.
- Establecer un programa de vacunación con base en la identificación de los subgenotipos con mayor predominancia en la región como parte de un plan de prevención de la DVB.
- Establecer el estatus epidemiológico del VDVB en las diferentes poblaciones ganaderas del país.

REFERENCIAS

[ACUERDO] mediante el cual se enlistan las enfermedades y las plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. [Word: 20 de septiembre de 2007] Ciudad de México. DOF. http://dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=5001157. [consulta: enero de 2023]

Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96*(22), 12766-12771.

Antos A, Miroslaw P, Rola J, Polak MP. 2021. Vaccination Failure in Eradication and Control Programs for Bovine Viral Diarrhea Infection. *Frontiers in veterinary science, 8,* 688911.

Baker JC. 1995. The clinical manifestation of bovine viral diarrhea infection. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice. 11*(3), 425-445.

Bálint A, Pálfi V, Belák S, Baule C. 2005. Viral sequence insertions and a novel cellular insertion in the NS2 gene of cytopathic isolates of bovine viral diarrhea virus as potential cytopathogenicity markers. *Virus genes, 30*(1), 49-58.

Basurto-Alcántara FJ, Lagunes-Quintanilla R, Roldán-Rodríguez V, Valdez-Espinoza U, Gómez-Romero N. 2022. Genetic characterization of bovine viral diarrhea virus detected in backyard cattle farms in Mexico. *Mexican Journal of Biotechnology, 7*(4), 1-13.

Becher P, Orlich M, Kosmidou A, König M, Baroth M, Thiel HJ. 1999. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology, 262*(1), 64-71.

Brock KV, Redman DR, Vickers ML, Irvine NE. 1991. Quantitation of bovine viral diarrhea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 3*(1), 99-100.

Brodersen BW. 2004. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. *The Veterinary Clinics of North America. Food animal practice, 20*(1), 85-93.

Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ, Pocock DH. 1987. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Annales de recherches veterinaires. Annals of veterinary research, 18*(2), 157-166.

Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. 1984. Experimental and fatal production of fatal mucosal disease in cattle. *The Veterinary record, 114*(22), 535-536.

Burks JM, Zwieb C, Müller F, Wower IK, Wower J. 2011. Comparative structural studies of bovine viral diarrhea virus IRES RNA. *Virus research, 160* (1-2), 136-142.

Cantú A, Ortega-S JA, Mosqueda J, Garcia-Vazquez Z, Henke SE, George JE. 2008. Prevalence of infectious agents in free-ranging white-tailed deer in northeastern Mexico. *Journal of wildlife diseases, 44*(4), 1002-1007.

Carlsson U, Fredriksson G, Alenius S, Kindahl H. 1989. Bovine virus diarrhoea virus, a cause of early pregnancy failure in the cow. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A, 36*(1), 15-23.

Correa-Girón P, Brown LN, Bryner JH. 1975. Presencia de anticuerpos contra rinotraqueitis infecciosa, diarrea viral bovina, parainfluenza 3, brucelosis, leptospirosis, vibriosis y Haemophilus somnus en sueros de bovinos con problemas patológicos reproductivos y respiratorios. *Tec Pecu Mex,* 29:26-33.

Chernick A, Godson DL, van der Meer F. 2014. Metadata beyond the sequence enables the phylodynamic inference of bovine viral diarrhea virus type 1a isolates from Western. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 28,* 367-374.

da Silva Silveira C, Maya L, Casaux ML, Schild C, Caffarena D, Aráoz V, da Costa RA, Macías-Rioseco M, Perdomo Y, Castells M, Colina R, Fraga M, Riet-Correa F, Giannitti F. 2020. Diseases associated with bovine viral diarrhea virus subtypes 1a and 2b in beef and dairy cattle in Uruguay. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 51*(1), 357-368.

Data México (2022). Disponible en: https://datamexico.org/ [citado el 09/01/2023].

de la Cruz Torres E. (2021). *Importancia Agrícola y Ganadera de la Laguna.* Disponible en: http://www.trcimplan.gob.mx/blog/importancia-agricola-y-ganadera-de-la-laguna-jun-2021.html [consultado el 09/01/2023].

Deregt D, Loewen KG. 1995. Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne, 36*(6), 371-378.

Dubovi EJ. 1992. Genetic diversity and BVD virus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 15*(3), 155-162.

Edwards S. 1990. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 9*(1), 115-130.

Elbers K, Tautz N, Becher P, Stoll D, Rumenapf T, Thiel HJ. 1996. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. J Virol 70, 4131-4135.

Evans C.A., Pinior B., Larska M., Graham D., Schweizer M., Guidarini C., Decaro N., Ridpath J., Gates M.C. 2019. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transboundary and emerging diseases, 66*(2), 640-652.

Factor C, Yus E, Eiras C, Sanjuan ML, Cerviño M, Arnaiz I, Diéguez F. 2016. Genetic diversity of bovine viral diarrhea viruses from the Galicia region of Spain. *Veterinary record open, 3*(1).

Fernández F, Constantini V, Barrandeguy M, Parreño V, Schiappacassi G, Maliandi F, Leunda M, Odeón A. 2009. Evaluation of experimental vaccines for bovine viral diarrhea in bovines, ovines and guinea pigs. *Revista argentina de microbiología, 41*(2), 86-91.

Fritzen JTT, Morettin AB, Lorenzetti E, Alfieri AF, Alfieri AA. 2021. Bovine viral diarrhea virus subgenotype 1a in a mummified fetus from a Brazilian dairy cattle herd. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 33*(5), 966-968.

Giangaspero M, Harasawa R, Weber L, Belloli A. 2008. Taxonomic and epidemiological aspects of the bovine viral diarrhoea virus 2 species through the observation of the secondary structures in the 5' genomic untranslated region. *Veterinaria italiana, 44*(2), 319-345.

Goens S. D. 2022. The evolution of bovine viral diarrhea: a review. *The Canadian veterinary journal= La revue veterinaire canadienne, 43*(12), 946-954.

Gómez-Romero N, Basurto-Alcántara FJ, Verdugo-Rodríguez A, Bauermann FV, Ridpath JF. 2017. Genetic diversity of bovine viral diarrhea virus in cattle from Mexico. *Journal of veterinary diagnostic investigation: Official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 29*(3), 362-365.

Gómez-Romero N, Ridpath JF, Basurto-Alcántara FJ, Verdugo-Rodríguez A. 2021. Bovine Viral Diarrhea Virus in Cattle From Mexico: Current Status. *Frontiers in veterinary science, 8,* 673577.

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

Goto Y, Yaegashi G, Fukunari K, Suzuki T. 2021. Clinical Analysis for Long-Term Sporadic Bovine Viral Diarrhea Transmitted by Calves with an Acute Infection of Bovine Viral Diarrhea Virus 2. *Viruses, 13*(4), 621.

Groomer B, Beer M, Liebler-Tenorio E, Greiser-Wilke I. 2001. Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *The Journal of general virology, 82*(Pt 11) 2597-2605.

Grooms DL. 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice. 20*(1), 5-19.

Heimann M, Roman-Sosa G, Martoglio B, Thiel HJ, Rümenapf T. 2006. Core protein of Pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J. Virol.* 80: 1915-1921.

Houe H, Lindberg A, Moennig V. 2006. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 18*(5), 427-436.

Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection. *Veterinary microbiology, 64*(2-3), 89-107.

Houe H. 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization, 31*(2), 137-143.

Hulst MM, van Gennip HG, Vlot AC, Schooten E, de Smit AJ, Moormann RJ. 2001. Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication *in vivo* and virulence. *Journal of virology, 75*(20), 9585-9599.

ICTV (2023). International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV. Disponible en: https://ictv.global/ [Consultado en febrero del 2023].

Iqbal M, Poole E, Goodbourn S, McCauley JW. 2004. Role for bovine viral diarrhea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *Journal of virology, 78*(1), 136-145.

Khodakaram-Tafti A, Farjanikish GH. 2017. Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iranial journal of veterinary research, 18*(3), 154-163.

Konstantinos G Kokkonos, Nicolas Fossat, Louise Nielsen, Christina Holm, Wytske M Hepkema, Jens Bukh, Troels KH Scheel. 2020. Evolutionary selection of pestivirus variants with altered or no microRNA dependency. *Nucleic Acids Res.* 48:5555-5571

Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP, Brownlie J. 2014. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Veterinary journal (London, England : 1997), 199*(2), 201-209.

Larghi M. 2018. Comparative study in the control of bovine viral diarrhea. *Animal health research reviews, 19*(2), 125-133.

Lecot S, Belouzard S, Dubuisson J, Rouillé Y. 2005. Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology, 79* (16), 10826-10829.2005

Lindberg AL. 2003. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. *The veterinary quarterly.* 25(1), 1-16

Liu C, Liu Y, Liang L, Cui S, Zhang Y. 2019. RNA-Seq based transcriptome analysis during bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection. *BMC genomics 20*(1), 774

Luzzago C, Ebranati E, Sassera D, Lo Presti A, Lauzi S, Gabanelli E, Ciccozzi M, Zehender G. 2012. Spatial and temporal reconstruction of bovine viral diarrhea virus genotype 1 dispersion in Italy. *Infection, genetics and evolution: Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 12* (2), 324-331.

Mahony TJ, McCarthy FM, Gravel JL, Corney B, Young PL, Vilcek S. 2005. Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. *Veterinary microbiology, 106* (1-2), 1-6

Maurer K, Krey T, Moennig B, Thiel HJ, Rümenapf T. 2004. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *Journal of virology, 78*(4), 1792-1799.

Medina-Gudiño J, Gómez-Romero N, Ramírez-Lezama J, Padilla-Noriega L, Venegas-Cureño E, Basurto-Alcántara FJ. 2022. Detección del virus de la diarrea viral bovina en artiodáctilos silvestres en cautiverio en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 13*(3), 612-624.

Meyling A, Houe H, Jensen AM. 1990. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Revue scientifique et technique (International Offices of Epizootics), 9*(1), 75-93.

Moennig V, Liess B. 1995. Pathogenesis of intrauterine infection with bovine viral diarrhea virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice, 11*(3), 477-487.

Murphy FA,Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. 1999. Veterinary Virology. Third edition. Academic Press. 555-569. 629 págs.

Navarro-López R, Pérez de la Rosa JD, Rocha-Martínez MK, Villarreal-Silva M, Solís-Hernández M, Rojas-Torres E, Gómez-Romero N. 2023. Characterization of bovine viral diarrhea virus 1b from mucosal disease. *Revista mexicana de ciencias pecuarias, 14*(1), 248-259.

Neil J.D. 2013. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, *41*(1), 2–7.

Newcomer BW, Neil JD, Marley MS, Ridpath JF, Givens MD. 2013. Mutations induced in the NS5B gene of bovine viral diarrhea virus by antiviral treatment convery resistance to the compound. *Virus research,* 174 (1-2), 95-100

Nuttall PA. 1980. Growth characteristics of two strains of bovine viral diarrhoea virus. *Archives of virology, 66*(4), 365-369.

Olafson P, MacCallum AD, Fox A. 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet*. 36: 205-213.

Pecora A, Malacari DA, Pérez Aguirreburualde MS, Bellido D, Escribano JM, Dus Santos MJ, Wigdorovitz A. 2015. Development of an enhanced bovine viral diarrhea virus subunit vaccine based on E2 glycoprotein fused to a single chain antibody which targets to antigen-presenting cells. *Revista argentina de microbiología, 47*(1), 4-8.

Pellerin C, van den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology, 203*(2), 260-268.

Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M. 2010. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary research 42*(6), 44.

Polak MP, Kuta A, Rybałtowski W, Rola J, Larska M, Zmudziński JF. 2014. First report of bovine viral diarrhoea virus-2 infection in cattle in Poland. *Veterinary journal (London, England: 1997), 202*(3), 643-645.

Quintero Barbosa J, Corredor Figueroa AP, Salas SS, Camargo H, Sanchéz A, Tobón J, Ortiz D, Schachtebeck E, Gutierrez MF. 2019. High prevalence of persistently infected animals ffrom bovine viral diarrhea in Colombia cattle. *BMC Vet Res. 10;15*(1):23

Rajput MKS, Abdelsalam K, Darweesh MF, Braun LJ, Kerkvliet J, Hoppe AD, Chase CCL. 2017. Both cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhea virus (BVDV) induced autophagy at a similar rate. *Veterinary immunology and immunopathology, 193-194*, 1-9.

Richter V, Lebl K, Baumgartner W, Obritzhauser W, Käsbohre A, Pinior B. 2017. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Veterinary Journal.* 220, 80-87

Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. 1994. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology, 205*(1), 66-74.

Ridpath JF, Bolin SR. 1998. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Molecular and cellular probes, 12*(2), 101-106.

Ridpath JF, Neill JD, Frey M, Landgraf JF. 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 of BVDV from North America. *Veterinary microbiology, 77*(1-2), 145-155.

Ridpath JF, Neill JD. 2016. Challenges in Identifying and Determining the Impacts of Infection with Pestiviruses on the Herd Health of Free Ranging Cervid Population. *Frontiers in microbiology*. 7:921

Sagar M. Goyal, Ridpath JF. 2008. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control. Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1002/9780470344453

Saliki JT, Dubovi EJ. 2004. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infection. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice, 20*(1), 69-83.

Sandvik T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary microbiology, 64* (2-3), 123-134.

Scharnböck B, Roch F F, Richter V, Funke C, Firth C L, Obritzhauser W, Baumgartner W, Käsbohrer A, Pinior B. 2018. A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population. *Scientific reports, 8*(1), 14420.

Sentsui H, Nishimori T, Kirisawa R, Morooka A. 2001. Mucosal disease induced in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus by antigenically different cytopathic virus. *Archives of virology, 146*(5), 993-1006.

Smith D. B., Meyers G., Bukh J., Gould E.A., Monath T., Scott Muerhoff A., Pletnev A., Rico-Hesse R., Stapleton J. T., Simmonds P., Becher P. 2017. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *J Gen Virol*. Aug; 98(8): 2106-2112.

Sólis-Calderon JJ, Segura-Correa VM, Segura-Correa JC. 2005. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk factors. *Preventive veterinary medicine, 72*(3-4), 253-262.

Sun JH, Kao CC. 1997. Characterization of RNA products associated with or aborted by a viral RNA-dependent RNA polymerase. *Virology, 236*(2), 348-353.

Suzan VM, Onuma M, Aguilar RE, Murakami Y. 1983. Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. *The Japanese journal of veterinary research, 31*(3-4), 125-132.

Tautz N, Tews BA, Meyers G. 2015. The Molecular Biology of Pestivirus. *Advances in virus research, 93,* 47-160.

Traven M, Alenius S, Fossum C, Larsson B. 1991. Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B, 38*(6), 543-462.

Vilcek S, Durkovic B, Kolesarova M, Paton DJ. 2005. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Preventive veterinary medicine, 72*(1-2), 31-219.

Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna MT, Paifi V. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archives of virology, 146*(1), 99-115.

Warrilow D, Lott WB, Greive S, Gowans EJ. 2000. Properties of the bovine viral diarrhoea virus replicase in extracts of infected MDBK cells. *Archives of virology, 145*(10), 2163-2171.

Wernike K, Schirrmeier H, Strebelow HG, Beer M. 2017. Eradication of bovine viral diarrhea virus in Germany-Diversity of subtypes and detection of live-vaccine viruses. *Veterinary microbiology, 208*, 25-29.

Wernike K, Schirrmeier H, Strebelow HG, Beer M. 2017. Eradication of bovine viral diarrhea virus in Germany-Diversity of subtypes and detection of live-vaccine viruses. *Veterinary microbiology, 208,* 25-29.

Yamane D, Kato K, Tohya Y, Akashi H. 2006. The double-stranded RNA-induced apoptosis pathway is involved in the cytopathogenicity of cytopathogenic Bovine viral diarrhea virus. *The Journal of general virology, 87*(Pt. 10), 2961-2970.

Yesilbag K., Alpay G., Becher P. 2017. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses*, 9(6), 128

ANEXOS

ANEXO 1. Identificación individual de los animales que resultaron positivos a la RT-PCR utilizando los diferentes iniciadores reportados.

Iniciadores 5'UTR/START

Producción 1		
373	506	613
484	590	566
68	151	55
513	365	
163	541	
Producción 2		
22575	25025	22103
Producción 3		
619	360	3132
2093		

Iniciadores VIL 324/326

Producción 1		
578	548	428
345	566	506
151		
Producción 2		
31313	22612	22609
22667	22103	22375
40085		
Producción 3		
938	1934	3764
3781	608	2019
3693	1786	3504
1934	2667	2442
3132		