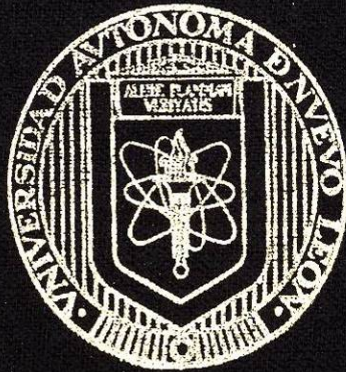


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA



**DETECCION Y DIFERENCIACION MOLECULAR DEL VIRUS
DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (BVDV) EN EL SISTEMA
VACA-CRIA EN NUEVO LEON**

TESIS

**QUE EN OPCION AL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

DAVID DOMINGUEZ DIAZ

MONTERREY, NUEVO LEON

JUNIO DEL 2006

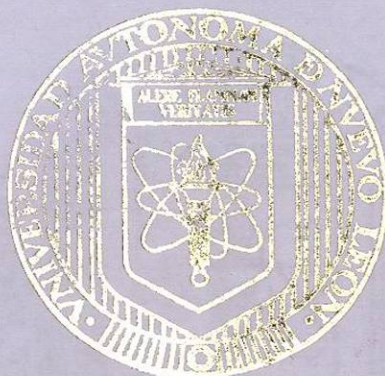
TE
SF967
.M78
D66
2006
c.1



1080092006

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA



DETECCION Y DIFERENCIACION MOLECULAR DEL VIRUS
DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (BVDV) EN EL SISTEMA
VACA-CRIA EN NUEVO LEON

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

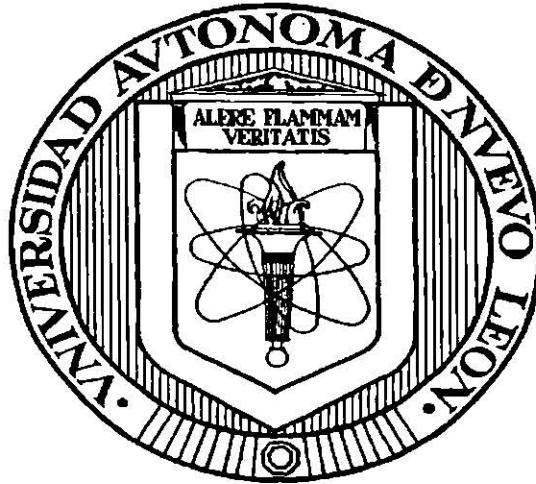
DAVID DOMINGUEZ DIAZ

MONTERREY, NUEVO LEON

JUNIO DEL 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**Detección y Diferenciación Molecular del Virus de la Diarrea Viral Bovina
(BVDV) en el sistema vaca-cría de Nuevo León**

T E S I S

**QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

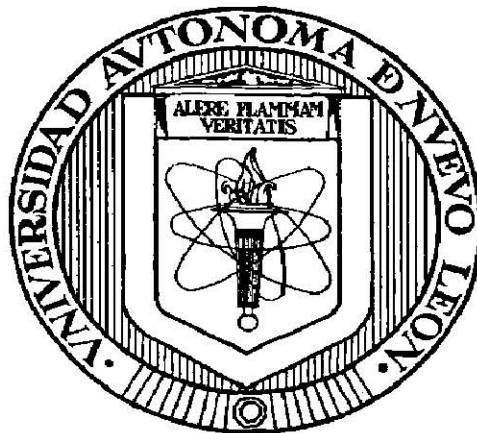
DAVID DOMÍNGUEZ DÍAZ

MONTERREY, N.L.

JUNIO DE 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Detección y Diferenciación Molecular del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) en el sistema Vaca-cría de Nuevo León

REVISADA POR:

Dr. Ramiro Avalos Ramírez
ASESOR PRINCIPAL

Dra. Sibilina Cedillo Rosales
CO-ASESOR

Dr. José A. Salinas Meléndez
CO-ASESOR

Dr. Pablo Zapata Benavides
CO-ASESOR EXTERNO

MC. Alicia G. Marroquín Cardona
CO-ASESOR

Dedicatoria

Con mucho cariño y admiración para mi madre Soledad Díaz Calvo (Sole),
por todo su esfuerzo, dedicación y entrega para conmigo.

Agradecimientos

Ofrezco mis agradecimientos a mi padre Aurelio F. Domínguez Santiago, por toda su ayuda a lo largo de mi vida, a mis hermanas Erika Domínguez Díaz y Anabel Domínguez Díaz, por su compañía y apoyo.

Agradezco a mi asesor el Dr. Ramiro Ávalos Ramírez por el apoyo y consejos brindados para el desarrollo de este trabajo, de la misma forma agradezco a la Dra. Sibilina Cedillo Rosales por su tiempo empleado y apoyo en la colaboración de este estudio, así como al Dr. José Antonio Salinas Meléndez.

Agradezco también a todos mis maestros de la Facultad de Medicina Veterinaria, que contribuyeran en mi formación.

Muchísimas gracias también a Ma. Isabel López González, Benito Ávila Jaime, Francisco David Sánchez Ortiz (Dengue), Priscila Maritza Carrillo Treviño por su amistad y ayuda en el trabajo de laboratorio. Gracias también a la MC. Alicia Guadalupe Marroquín Cardona, por la enseñanza en las tareas del laboratorio.

Índice

Contenido	Página
Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Índice	III
Índice de Figuras	VII
Índice de Cuadros	VII
Abreviaturas	VIII
Resumen	IX
1 Introducción	1
1.1 Justificación	4
1.2 Hipótesis	5
1.3 Objetivos	5
1.3.1 General	5
1.3.2 Específicos	5
1.4 Metas	6
2 Antecedentes	7
2.1 Historia del BVDV	7
2.2 BVDV en México	11

2.2.1 BVDV en Nuevo León	13
2.2.1.1 Sistema Vaca-Cría	14
2.3 Mecanismos de Propagación del BVDV en el Hato	15
2.4 Taxonomía y Biología Molecular del BVDV.....	18
2.4.1 Taxonomía	18
2.4.2 Biología Molecular	19
2.4.2.1 <i>replicación?</i> Replicación Viral	24
2.5 Modelos de Infección del BVDV	25
2.5.1 Infección Aguda	25
2.5.2 Infecciones Persistentes	27
2.5.3 Enfermedad de las Mucosas	27
2.6 Diagnóstico	28
3 Materiales y Métodos	32
3.1 Lugar de realización de la investigación	32
3.2 Procedencia de las muestras de campo	32
3.2.1 Colección y Manejo de muestras	32
3.3 Análisis serológico por la infección del BVDV	33
3.4 Extracción del Ácido Ribonucleíco (ARN)	34

3.5 Protocolo de RT-PCR para <i>Pestivirus</i>	35
3.5.1 Dilución de Iniciadores	35
3.5.2 Programa de Termociclador	36
3.5.3 Condiciones de RT-PCR	36
3.6 Protocolo de RT-PCR y snPCR para BVDV-1	38
3.6.1 Dilución de Iniciadores	38
3.6.2 Programa de Termociclador	38
3.6.3 Condiciones de RT-PCR	39
3.6.4. Dilución de Iniciadores para snPCR	40
3.6.5. Programa de Termociclador para snPCR	41
3.6.6 Condiciones de snPCR	41
3.7 Protocolo de snPCR para BVDV-2	43
3.7.1 Dilución de Iniciadores	43
3.7.2 Programa de Termociclador	43
3.7.3 Condiciones de snPCR	44
3.8. Verificación de productos amplificados.....	45
4 Resultados	46
4.1 Serología contra BVDV en los hatos estudiados	46

4.2 Obtención y calidad de ARN total	47
4.3 Detección de <i>Pestivirus</i> en muestras clínicas	47
4.4 Genotipificación de los productos amplificados	50
4.5 Globales	52
5 Discusión	55
6 Conclusión	59
7 Literatura Consultada	60
Apéndice	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Organización del Genoma de los <i>Pestivirus</i> y el procesamiento de la poli proteína	21
2	Microfotografía Electrónica de Contraste Negativo de partículas del Virus de Diarrea Viral Bovina-1 (BVDV-1)	22
3	Verificación de extracción de RNA de muestras de campo, en un gel de Agarosa al 1.8% y poliacrilamida al 9%	47
4	RT-PCR para <i>Pestivirus</i> en gel de agarosa al 1.8%	48
5	RT-PCR para <i>Pestivirus</i> en gel de poliacrilamida al 9%	48
6	RT-PCR y snPCR para BVDV-1, en gel de acrilamida al 9%	50
7	snPCR para BVDV-2, en gel de agarosa al 1.8%	51
8	snPCR para BVDV-2, en gel de acrilamida al 9%	51
9	Gel General	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cronología del BVDV	7
2	Programa del termociclador para RT-PCR de secuencias de <i>Pestivirus</i> .	36
3	Programa de Termociclador para RT-PCR de BVDV-1	39
4	Condiciones de RT-PCR para BVDV-1	39
5	Programa de Termociclador para snPCR de BVDV-1	41
6	Programación del Termociclador para el snPCR de BVDV-2	44
7	Condiciones para el snPCR de BVDV-2	45
8	Relación de la seropositividad frente a BVDV en Hatos bovinos del Estado de Nuevo León, con falta de vacunación contra BVDV	46
9	Relación entre reacción serológica y la detección de secuencias de <i>Pestivirus</i> en muestras clínicas	49
10	Relación entre las pruebas de ELISA y RT-PCR en la detección del Virus de la Diarrea Viral Bovina en muestras de campo del sistema vaca-cría.	54

ABREVIATURAS

bp	bases pares
BVDV	Bovine Viral Diarrhoea Virus
BVDV-1	Bovine Viral Diarrhoea Virus type 1
BVDV-2	Bovine Viral Diarrhoea Virus type 2
°C	Grados Centígrados
cADN	Copia del Ácido Dexorribonucleico
dNTP's	Dinucleotidos trifosfatados
DEPC	Dietyl Pirocarbonato
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetrácetico
ELISA	Inmunoensayo Ligado a Enzima
H ₂ ODEPC	Agua tratada con Dietyl Pirocarbonato
KDa	Kilo daltones
mA	mili amperes
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
mM	Milimolar
µl	Microlitro
nm	nanómetro
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI	Persistentemente Infectado
pml	Picomoles
ARN	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcriptasa Reversa -Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
snPCR	"semi nested"- Reacción en Cadena de la Polimerasa
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
U	Unidades
UV	Ultravioleta
v/v	volumen sobre volumen
V	voltios
W	watts
w/v	peso sobre volumen

RESUMEN

David Domínguez Díaz

**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Unidad Investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas

Título del Estudio: Detección y Diferenciación Molecular del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) en el sistema Vaca-cría de Nuevo León.

Área de Estudio: Enfermedades Infecciosas, detección y diferenciación molecular de virus.

Objetivo y Metodología del Estudio: Detectar mediante métodos de biología molecular la presencia y circulación del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), género *Pestivirus* (*Flaviviridae*), en bovinos del sistema vaca-cría del estado de N.L. y evidenciar la presencia de las especies BVDV-1 y BVDV-2 en esta región. Se obtuvieron 73 muestras de sangre de animales de 5 hatos seropositivos contra el BVDV y sin antecedentes de vacunación contra el virus. Mediante estuches comerciales convencionales se extrajo RNA de leucocitos y plasma de animales y de los controles. El RNA total fue sujeto a RT-PCR con ligeras modificaciones de recomendaciones de trabajos previos. Las secuencias de *Pestivirus* fue llevada a cabo con iniciadores que reconocen secuencias altamente conservadas dentro de este género (Avalos, R.R., 2002). BVDV-1 y BVDV-2 fueron evidenciados con diferentes estrategias moleculares basados en PCR "semi-anidado" y el uso de iniciadores que reconocen secuencias específicas para cada una de estas dos especies (Cedillo, R.S., 2004).

Resultados: En 26 de los 73 animales analizados se encontró evidencia de secuencias de *Pestivirus* en sangre. 17 de los 26 "RT-PCR" positivos resultaron negativos a la detección de anticuerpos empero solo 9 fueron seropositivos al virus. En 3 de los hatos se encontró que circulan tanto el BVDV-1 como el BVDV-2 dentro de cada uno de los hatos. De 19 muestras positivas a *Pestivirus* y seleccionadas al azar fueron subsecuentemente usadas para determinar la presencia de ambas especies de *Pestivirus*. Fue posible evidenciar que el BVDV-1 ocurrió en el 57.9% mientras que BVDV-2 en el 42.1%, de estas muestras. No obstante, ambas especies fueron encontradas en animales seropositivos y seronegativos al BVDV en diferentes hatos. En uno de los hatos analizados fue posible obtener evidencia de 3 animales persistentemente infectados (PI) con el BVDV. En dos de estos casos el genotipo circulante fue el BVDV-1 y solo uno correspondió al BVDV-2. De acuerdo a la población total de este hato se estimó una prevalencia del 3%.

FIRMA DEL ASESOR: _____

1 Introducción

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), es considerado uno de los agentes virales con mayores repercusiones sobre la economía pecuaria a nivel mundial. Este virus, miembro del género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* (Thiel, H.J.; 2000), es endémico en diversas poblaciones de bovinos independientemente del propósito zootécnico. En algunas regiones se ha descrito que la frecuencia e incidencia del BVDV ha llegado a exceder hasta el 70% (Houe, H; 2003). BVDV ocasiona un sinnúmero de alteraciones en los bovinos que afectan los sistemas respiratorio, digestivo, reproductivo e inmunológico. No obstante, los síntomas clínicos varían dependiendo de la cepa, el estado inmune, etapa reproductiva y la presencia de coinfecciones con otros patógenos. Con ello las infecciones agudas pueden variar desde subclínicas hasta altamente fatal (Brock, K.V.; 2003). BVDV al suprimir la actividad del sistema inmune puede aumentar la susceptibilidad contra agentes infecciosos secundarios. No obstante, en el sistema vaca-cría el mayor impacto acontece cuando la infección ocurre cerca del período del empadre o durante la preñez. Las consecuencias pueden resultar en infertilidad, repetición de calores, bajas tasas de concepción, abortos, malformaciones fetales o generación de animales persistentemente infectados (PI) (Siegwart, N.; 2005). Esta última condición es una característica sobresaliente de la infección por BVDV. Los animales PI son generados cuando el virus invade al feto antes del desarrollo del sistema inmune; lo cual ocurre aproximadamente entre los 90 y 120 días de la

gestación (Goyal, S.M.; 2005). Los PI juegan un papel importante en la epidemiología y difusión del BVDV (Houe, H; 2003). En estos animales el virus se replica en altos títulos y liberan una gran cantidad de virus al medio ambiente, exponiendo así a los demás animales de la ganadería. La identificación y remoción de los PI del medio es la base para un adecuado control y erradicación del BVDV en los hatos (Brownlie, J.; 1998). Eventualmente los PI desarrollan la enfermedad de la mucosas (EM), la cual es una condición clínica fatal desarrollada después de cambios en el genoma viral de la cepa de BVDV con la que el animal PI había sido infectado inicialmente, dichos cambios pueden estar influenciados por mutaciones puntuales, inserciones de genes celulares, fallas en el copiado del genoma, recombinaciones con cepas vacunales y/o cepas de campo (Fray, M.D.; 2000).

Las cepas del BVDV han sido clasificadas en biotipos citopáticos (cp) y no citopáticos (ncp) según su habilidad para inducir muerte celular en células cultivadas in Vitro (Lindenbach, B.D.; 2001). El biotipo ncp es el responsable de más del 90% de las infecciones de campo y además es el responsable de la generación de los animales PI, ya que este es capaz de atravesar la barrera placentaria e invadir al feto a diferencia del biotipo cp, del cual no se ha reportado esta habilidad (Goyal, S.M.; 2005).

No obstante, BVDV ha sido subdividido en los genotipos BVDV-1 y BVDV-2 en base a diferencias genéticas manifestadas en el genoma de las cepas del BVDV aisladas hasta la fecha. Estas diferencias también se ven reflejadas a nivel antigénico por lo que se reconoce que BVDV-1 y BVDV-2 son dos especies distintas

dentro del género *Pestivirus* (Fulton, R.W.; 2003). Cada especie es heterogénea y antigénicamente distinta de tal forma que, se ha propuesto que esta configurada por diversos subgrupos. Para BVDV-1 se ha sugerido la existencia de más de 10 subgrupos empero para BVDV-2 al menos 3 (Ridpath, J.F.; 2003). Esta amplia variación manifestada por el BVDV obstaculiza los sistemas de prevención y control basados en la vacunación y el diagnóstico de la infección. Además, dado el amplio espectro clínico que BVDV induce, el diagnóstico basado en historial clínico, síntomas y lesiones postmortem solo pueden considerarse presuntivos (Grooms, D; 2002).

El diagnóstico específico de BVDV constituye una parte fundamental para detectar y erradicar la infección por este virus. La presencia o actividad de BVDV puede revelarse mediante métodos serológicos, virológicos y moleculares. Cada uno de ellos presenta ventajas y desventajas en su ejecución, no obstante la precisión, sensibilidad y especificidad de cada uno de ellos esta influenciada por una multitud de factores. Dentro de estos últimos se destacan la toma y el manejo de la muestra, la patogénesis y el operador, entre otros (Goyal, S.M., 2005). Actualmente, debido a la rapidez, alta sensibilidad y especificidad, el RT-PCR es considerado un método estándar de diagnóstico específico de BVDV en diversas partes del mundo. Este método detecta la presencia del genoma viral al amplificar in Vitro fragmentos previamente seleccionados en base a secuencias altamente conservadas en estos virus. En nuestra región carecemos de esta tecnología para detectar la infección específica por BVDV, por lo que en el presente trabajo, y en

apoyo al reconocimiento del BVDV como causa de aborto y falla reproductiva, se establecieron las condiciones para detectar al BVDV mediante RT-PCR a partir de sangre completa de bovinos de hatos de Nuevo León. Igualmente se demostró la circulación tanto de BVDV-1 como de BVDV-2 mediante PCR semi-anidado (snPCR).

1.1 Justificación

La infección por el Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) conduce a un sin número de alteraciones en los bovinos. A nivel económico las consecuencias más graves para la ganadería del BVDV se observan en el sistema vaca-cría, en el cual puede inducir trastornos reproductivos que repercuten severamente en la producción. En nuestra zona se carecen de datos de la frecuencia y distribución de este importante patógeno y además no se conoce que genotipos son los que circulan en nuestra población bovina. El establecimiento del diagnóstico molecular basado en RT-PCR (Transcriptasa Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa) de la infección por el BVDV y la diferenciación de los genotipos BVDV-1 y BVDV-2 mediante PCR "semi-anidado" (snPCR), nos permitirán revelar no solo la presencia molecular de BVDV y sus genotipos sino que también nos facultarán el contar con una estrategia diagnóstica de alta relevancia para detectar a este patógeno; misma que podría servir de apoyo para el control del BVDV.

1.2 Hipótesis

Dados los mecanismos de patogenicidad y persistencia en la naturaleza, es factible que el Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), se encuentre circulando en hatos con sistema vaca-cría, y su presencia en estos animales, se puede evidenciar mediante métodos moleculares.) ^{HOI}

NO ES HIPOTESIS

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Establecer mediante la técnica de RT-PCR el diagnóstico molecular de la infección por el BVDV, como soporte al reconocimiento de este patógeno causante de aborto, infertilidad y alteraciones respiratorias en el sistema vaca-cría de hatos de Nuevo León.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Instituir el procedimiento de RT-PCR para el diagnóstico de la infección por el BVDV.
- Implementar las técnicas de RT-PCR y snPCR para el diagnóstico y diferenciación de BVDV-1 y BVDV-2.
- Detectar animales persistentemente infectados con BVDV en hatos de NL.

1.4 Metas

- Establecer un sistema de diagnóstico sensible y específico de una de las infecciones virales de mayor importancia para la ganadería bovina del área.
- Apoyar a la producción pecuaria mediante el reconocimiento oportuno de una de las causas más importantes y frecuentes de falla reproductiva bovina
- Iniciar un banco de datos para apoyar estudios de prevalencia, incidencia así como de frecuencia de los diversos genotipos y subgrupos genéticos del BVDV en la zona noreste de México.

2 Antecedentes

2.1 Historia del BVDV

Para conocer la historia de un agente en particular es necesario hablar de la importancia económica del determinado agente en una región; en lo que concierne al BVDV este patógeno fue adquiriendo importancia a medida que las manifestaciones clínicas fueron más severas y cada vez que se encontraron nuevas y más virulentas variantes del virus. Por lo tanto cabe mencionar dos grandes sucesos que marcaron el punto de partida del conocimiento de este virus, el primero de ellos se refiere a los brotes de diarrea aguda con presentaciones severas ocurridas en los años 40's en el Oeste de Canadá a lo cual los veterinarios e investigadores de ese tiempo la llamaron enfermedad "X". El segundo acontecimiento relevante fue la aparición de un síndrome hemorrágico originado en los 80's que cambió todo el concepto de BVDV (Goens, S. D.; 2002).

A continuación se enlistan en forma cronológica los acontecimientos más importantes del agente BVDV, desde su aparición hasta los nuevos conocimientos que hoy se originan.

Cuadro 1. Cronología del BVDV

Año	Acontecimiento
1940	Se describe por primera vez una enfermedad de origen desconocido en el Oeste de Canadá. Se le atribuye el nombre de enfermedad "X" y con dos formas de presentación: subaguda y aguda; se creyó que el primer tipo se había presentado por años, mientras que la forma aguda

	<p>se caracteriza por 7 a 10 días de enfermedad en animales jóvenes culminando con la muerte. Los signos clínicos que se describen son: pírexia, diarrea acuosa sanguinolenta, deshidratación, tenesmo, taquipnea, taquicardia, anorexia, lagrimeo excesivo, descarga nasal, hiperventilación, y desarrollo de úlceras en las narinas, hocico y en las membranas mucosas de la cavidad oral, el reporte original también describe lesiones en la piel, sobre las regiones inguinal y perineal, así como en el interior de muslos y orejas.</p>
1946	<p>Se presentan en Estados Unidos brotes de una aparente nueva enfermedad que los clínicos reportan signos similares a los de la enfermedad "X", solo que esta nueva enfermedad se presentan más signos respiratorios, leucopenia, disminución de la producción de leche e incremento de la tasa de abortos. La naturaleza infecciosa de estos brotes fueron confirmados por el uso de "dosis infectante", en los inicios de estos experimentos Olafson y colaboradores utilizaban muestras de heces de animales afectados severamente, pero observaron que los signos clínicos no se reproducían. Posteriormente se utilizó una emulsión de bazo y sangre de animales enfermos en forma aguda, con estos experimentos algunos animales presentan signos leves y solo en algunos casos, después de una diarrea se observaban úlceras orales, por lo que a esta enfermedad reproducible recibe el nombre de diarrea viral del ganado.</p>
1950	<p>Veterinarios de Iowa, Estados Unidos describen una nueva enfermedad con similitudes a la diarrea viral del ganado, en esta nueva presentación las descargas nasales se tornan muco purulentas, las lesiones de la nueva enfermedad son muy variadas, aunque se reconocen erosiones y hemorragias del tracto intestinal con poca infiltración de células inflamatorias, por último es denominado este</p>

	nuevo síndrome como enfermedad de las mucosas.
1957	Investigadores realizan cultivos celulares en donde incluyen al virus de la diarrea viral del ganado y los aislados del síndrome de enfermedad de las mucosas, observando que estos aislados pueden clasificarse como: aquellos que no inducen muerte celular (no citopáticos) y otros que provocan muerte celular (citopáticos)
1960	Investigadores de la Universidad de Cornell aislaron un virus citopático de un caso de diarrea viral del ganado en Oregon, a este virus se le dio el nombre de Oregon C24V.
1961	Se producen las primeras vacunas comerciales de virus vivo modificado a partir del Virus C24V, el uso indiscriminado de esta vacuna se asocia con muchas anormalidades reproductivas, inducción por parte de la vacuna al síndrome de Enfermedad de las Mucosas, defectos congénitos también se observan en becerros recién nacidos a partir de madres inmunizadas.
Finales de los 60s	Diferentes investigadores tratan de reproducir el síndrome de Enfermedad de la Mucosas con virus citopáticos, el resultado de estas investigaciones es diarrea viral del ganado en presentación leve. Gillespie <i>et al</i> compara los aislados de virus de la diarrea viral del ganado contra los virus aislados de casos del síndrome de Enfermedad de las Mucosas, encontrando que ambos están antigénicamente relacionados.

1970s	<p>Los experimentos se centran en infecciones en animales preñados y animales recién nacidos. Abortos y otros desórdenes teratogénicos se encuentran relacionados con infecciones intrauterinas con el virus de la enfermedad de diarrea viral del ganado. Con estos experimentos se logra descifrar la presencia de animales PI y el hecho de que estos animales sobreviven pocos meses o bien escasos años y poco después sucumben ante cualquier otra enfermedad grave. Un hecho relevante es el descubrimiento de la tolerancia por parte de los becerros ante una cepa específica no citopática del virus.</p>
1984	<p>Los Investigadores son capaces de reproducir el Síndrome de Enfermedad de las Mucosas, mediante al inoculación de una cepa citopática del BVDV a un PI, desencadenándose en pocos días el patrón referido para la Enfermedad de las Mucosas; de aquí nació el hecho de que la Enfermedad de las Mucosas solamente ocurre en animales Persistentemente Infectados (PI).</p>
A mediados de los 80s	<p>El Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) se clasifica dentro del género <i>Pestivirus</i>, junto con el Virus de la Enfermedad de la Frontera de los Ovinos (BVD) y el Virus de la Fiebre Porcina Clásica (CSFV); todos ellos pertenecientes a la familia <i>Togaviridae</i></p>
Finales de los 80s	<p>Se presentó un síndrome hemorrágico en ganado adulto y en terneras asociados con una cepa no citopática del BVDV, sin la presencia de una cepa citopática. Este nuevo síndrome se reporta con</p>

	los siguientes signos: fiebre, trombocitopenia marcada, diarrea sanguinolenta, epistaxis, petequias y equimosis en las mucosas de este brote se pudo aislar una cepa significativa, es la cepa conocida como 890.
1993	Se presentan brotes importantes en la región de los grandes Lagos, Québec, e Inglaterra con presentaciones similares a Enfermedad de las Mucosas (MD), Diarrea Viral Bovina en sus diferentes presentaciones, todas ellas afectando a ganado de carne, ganado lechero.

(Goens, S.D.; 2002; Perdrizet, J.; 1986)

2.2 BVDV en México

En México existen datos del año de 1973 en donde se estudiaron 47 sueros bovinos procedentes de los estados de Yucatán, Puebla, Estado de México y D.F., con historia clínica de problemas patológicos de los tractos respiratorio y reproductor. Se encontró que el 70% de estos sueros fueron positivos a la presencia de anticuerpos seroneutralizantes específicos contra el BVDV (Correa, G.P.; Brown, L.N., 1973). En 1981 se analizaron en un estudio a nivel nacional los anticuerpos seroneutralizantes en contra del BVDV, estos estudios fueron conducidos por la Universidad Nacional Autónoma de México a través de su Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. En este estudio se utilizó la técnica de seroneutralización con los sueros colectados mediante el sistema de

microtitulación en placa. Para la realización de dicho estudio se colectaron sueros de 314 bovinos, de los cuales se realizaron muestreos dobles a 89 bovinos con problemas reproductivos, en estos bovinos se colectaron días después del aborto y un segundo muestreo se realizó en los 15 a 21 días siguientes. Se determinaron anticuerpos seroneutralizantes contra el BVDV en 218 animales de 314 estudiados representando un 69%. Los animales positivos se distribuyeron en prácticamente todos los estados de la república, en algunos estados como Chiapas y Nuevo León se identificaron como negativos, pero esto se debió al reducido número de muestras provenientes de estos estados. Otros resultados importantes es el hallazgo de sueros positivos en un 100% en animales con edades de entre 6 a 12 meses, así como con un porcentaje de 86% para los animales de 1 a 3 años edad. También en este estudio resalta el hecho de que los animales reportados en su historial clínico con aborto, son positivos a BVDV en un 95%.(Villarreal, T.V., 1981).

En diferentes estudios conducidos en el país incluyen aquellos que tienen por objetivo conocer la prevalencia de poblaciones no vacunadas y además determinar los factores de riesgo potenciales para la presentación del BVDV en el hato. Uno de estos estudios fueron los realizados en el estado de Yucatán, en donde investigadores habían determinado la prevalencia del BVDV en un 28.8%, prevalencia que se uso en dicho trabajo para estimar la población a estudiar, que fue de 630 bovinos; los animales se muestrearon de Junio de 2001 a Julio de 2002. Los sueros se analizaron para determinar anticuerpos contra BVDV por

medio del uso de un estuche comercial de ELISA. En lo concerniente al estudio de los factores de riesgo, se obtuvieron por medio de la aplicación de una encuesta, en donde se incluía preguntas concernientes a la práctica de bioseguridad en el hato. En este estudio se encontró que 24 hatos de los 60 muestreados al menos tenían un animal seropositivo, encontrándose 79 bovinos seropositivos; se estimó una prevalencia del 14% y se encontró un efecto interesante al combinar el tamaño del hato y el origen de nuevos animales como factores riesgo, encontrándose una interacción significativa ($P < .05$) de estos factores; de todos los factores analizados se encontró que los mencionados anteriormente son estadísticamente importantes. (Solís, C.J.J.; 2005).

2.2.1 BVDV en Nuevo León

En la entidad existe evidencia de trabajos que se han orientado a determinar las causas más frecuentes de enfermedades reproductivas en el ganado, principalmente en el sistema vaca-cría. Se desarrolló un estudio para analizar un total de 740 sueros bovinos de 79 ranchos para el diagnóstico de leptospirosis, 485 sueros de 75 ranchos para IBR y BVDV, ubicados en 20 Municipios del estado. El diagnóstico se basó en la detección de anticuerpos por medio de ELISA, para estos dos últimos, mientras el diagnóstico de *Leptospira* spp, se basó en microaglutinación en placa. Se encontró en el caso particular de BVDV una prevalencia global de 29.27% y la prevalencia para ranchos fue de 53.30%. En este estudio se observaron prevalencias altas en los siguiente municipios: 66.67%

para Anáhuac, 64.29% para Dr. Coss, 57.35% para Lampazos y 51.85% para Los Ramones (Cantú, A, 2002).

Otros hallazgos recientes, son los del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León (CFPPNL), a través de su laboratorio de diagnóstico, en donde se remitieron de 2000 a 2003, 818 muestras de suero para análisis de anticuerpos en contra de BVDV y otros agentes, resultando positivas el 58% del total de las muestras enviadas, al mencionado patógeno (CFPPNL, 2004).

2.2.1.1. Sistema Vaca-Cría

Este sistema que se desarrolla en el Estado de Nuevo León, existe bajo condiciones de estrés nutricional, en la gran mayoría de los casos, debido a las condiciones ambientales que influyen la productividad de los agostaderos, ya que el estado tiene un rango promedio de precipitación pluvial de 250 a 325 mm³ anuales. El clima con mayor prevalencia en el estado es el seco muy cálido, con temperaturas promedio anuales que oscilan entre los 26 a 33 °C. Las razas que se explotan en este sistema son principalmente razas europeas (*Bos taurus*) y sus cruza. El tamaño del hato oscila alrededor de 140 animales, la carga animal se aproxima a 9 ha por unidad animal (Suárez, D.H.; 2002).

Existen tasas de concepciones de 37.6% en promedio, asistencia en el parto en promedio de 3%, presentación de celo después del parto entre 60 y 90 días, las vaquillas de reemplazo se cruzan generalmente alcanzando un peso entre 210 y 230 Kg de peso. La fertilidad de los machos se observa reducida, según han reportado algunos autores, ya que al analizar el semen de un grupo de sementales

al azar se encontró que en promedio existe un 16% de fertilidad dudosa (Mena, G. L.; 2002).

En el ámbito sanitario, el sistema vaca-cría está ampliamente desprotegido, debido a que la gran mayoría de los productores, si es que eventualmente realiza la práctica de inmunización de sus animales, solo lo hace con bacterinas comercialmente difundidas, descuidando el hato contra enfermedades virales; todo ello debido a la desinformación que existe entre los productores, sobre los efectos de diferentes agentes virales que pueden incrementar la baja productividad y además promoviendo infecciones secundarias subsecuentes. Uno de estos agentes inmiscuidos en el proceso antes descrito es sin duda alguna el BVDV, que tiene un abanico de manifestaciones clínicas, sin considerar las infecciones subclínicas (Mena, G. L.; 2002).

2.3 Mecanismos de Propagación del BVDV en el Hato

Los animales Persistentemente Infectados (PI) son los actores principales y más eficientes en la propagación del BVDV en el hato; ya que estos animales son el resultado de una infección temprana en útero, considerándose como tal, desde 90 a 120 días de gestación aproximadamente, la infección es llevada a cabo por un Biotipo no citopático de cualquier genotipo (BVDV 1 y BVDV 2), produciéndose así un animal inmunotolerante y por lo tanto un foco de infección constante a lo largo de su vida. Algunos trabajos que se han desarrollado con el objeto de demostrar la prevalencia de animales PI, han sugerido que en zonas endémicas de BVDV, estos animales se encuentran en 1 a 2% (Houe, H; 2003; Fulton, R.W.; 2005)

Las vías de contagio por los animales PI incluyen secreciones corporales en general, siendo las secreciones nasales las más potenciales en la infección directa e indirecta por contaminación de alimento, agua, instalaciones, utensilios y demás fomites que intervienen en la transmisión. En estudios recientes con el objeto de ilustrar la eficiencia de transmisión de BVDV por medio de animales PI, se colocaron en un corral 19 becerros seronegativos y 1 animal PI; obteniéndose como resultado una seroconversión del 68.4%, lo equivalente a 13 becerros infectados. (Brock, K.V.; 2003; Fulton, R.W.; 2005)

Otros estudios hechos en condiciones de pastoreo compartido entre hatos indican que existe una prevalencia de animales PI en un 7.7%, analizados mediante la determinación de antígeno en sangre; ya que como se mencionó anteriormente en estos animales no se promueve la producción de anticuerpos frente al virus. (Siegwart, N., 2005).

Las infecciones agudas, son otra fuente de introducción del virus en el hato susceptible, debido a la dispersión de partículas virales a través de secreciones continuas, por ello, es la responsable de la circulación constante del BVDV en la ganadería; la importancia de este estado clínico, radica en que la signología no es patognomónica de la infección y por lo tanto, se permite la conjunción con animales seronegativos. Las prácticas en donde se incluyan la mezcla de animales de diferentes edades, diferentes hatos, animales con problemas reproductivos, tales como, abortos, retención placentaria, retorno constante al estro y otras

signología clínicas en general; son un riesgo latente. oportuno y eficaz de transmisión y persistencia del BVDV. (Brock, KV.; 2003).

La reproducción en el hato es una actividad controversial para asegurar una genética apropiada, además de proveer materia prima para el funcionamiento de la ganadería; por estas razones primordiales, es necesario establecer actividades que promuevan su establecimiento; ya que el BVDV en su afán de sobre vivencia hace permisivos el tracto reproductor de hembras y machos disminuyendo su eficiencia. Algunos autores han reportado machos con seropositividad, sin viremia y con excreciones constantes del virus en semen; se ha sugerido que este acontecimiento es debió a que el animal se había infectado en la pubertad durante la formación de la barrera inmunológica en los testículos, permitiendo la replicación viral y la evasión de la respuesta inmunitaria local; de la misma forma ocurre con las hembras PI que llegan a vivir hasta el periodo reproductivo, donde los óvulos están contaminados con el virus, asegurando de esta forma que la progenie también sea PI. (Fray, M.D.; 2000)

La bioseguridad en un hato y región es un arma eficaz en contra de múltiples agentes etiológicos, por ello, varios autores han propuesto que en zonas de infección activa del BVDV se realicen muestreos serológicos cada 8 meses o más, para evaluar la nuevas seroconverisiones, identificar a los animales PI, evaluar a los animales nuevos en el hato, ya sean nacidos de madres nativas o bien aquellos de madres importadas, especialmente de madres con altos títulos de anticuerpos contra el BVDV, sin menospreciar a las seronegativas, o también

llamadas "caballos de Troya", ya que estas continuamente son PI y por ende tendrán a otro PI; además se debe considerar que la cuarentena de animales nuevos también forma parte de las actividades de bioseguridad y es prescindible llevarla a cabo. (Brownlie, 1998)

2.4 Taxonomía y Biología Molecular del BVDV

2.4.1 Taxonomía

Los miembros de la familia *Flaviviridae*, se caracterizan por ser virus ARN de cadena sencilla y de polaridad positiva; la familia comprende tres géneros importantes; el primero de ellos el género *Flavivirus* (del latín *flavus*, amarillo), en este grupo se integran arbovirus, siendo estos en su gran mayoría patógenos potenciales de humanos; el segundo género importante es el género *Hepacivirus* (del griego *hepar*, *hepatos*, hígado), virus causantes generalmente de hepatitis C y D; y por último el género *Pestivirus* (del latín *pestis*, plaga), los virus que se encuentran en este género son patógenos de animales, causantes de enfermedades de importancia económica y de distribución mundial. (Lindenbach, B.D.; 2001)

Las especies del género *Pestivirus* son responsables de un espectro muy amplio de enfermedades en sus huéspedes naturales; dentro de su familia comparten similitudes genómicas con el género *Hepacivirus*, actualmente el género contiene cuatro especies aceptadas: El Virus de la Fiebre Porcina Clásica (CSFV), El Virus de la Diarrea Viral Bovina -1 (BVDV-1), El Virus de la Diarrea Viral Bovina -2 (BVDV-2) y El Virus de la Enfermedad de la Frontera de los Ovinos

(BDV); estos últimos conocidos como Pestivirus de rumiantes y su infección tiene como consecuencias, problemas reproductivos, inmunosupresión, diarrea, trombocitopenia y frecuentemente con cursos inaparentes. En animales gestantes están relacionados con abortos, nacidos muertos, malformaciones e infección persistente de la progenie. (Lindenbach, B.D.; 2001; Becher, P., 1998)

2.4.2 Biología Molecular

El Virus de la Diarrea Viral Bovina, es un virus ARN de cadena sencilla, con polaridad positiva; usualmente el genoma mide 12.3 Kb. El genoma se encuentra organizado en un fragmento conocido como ORF (Open Reading Frame); región que es traducida en una poli proteína de aproximadamente 4,000 aminoácidos que a su vez está flanqueada por dos regiones UTR (Untranslated Regions); la primera de ellas es la 5' UTR de aproximadamente 372 a 385 nucleótidos, es la región con la que inicia el genoma y la última región UTR es la 3' con aproximadamente 229 a 273 nucleótidos, estas regiones no son codificantes, pero tienen funciones importantes en la replicación y síntesis de proteínas virales. La región ORF, es procesada en 11 proteínas virales maduras y están ordenadas como sigue: N^{pro}-C-E^{ns}-E1-E2-p7-NS2-3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B (Tautz, N.; 1999; Thiel, H.J.; 2000; Lindenbach, B.D., 2001).

La primera proteína del complejo es el N^{pro} es una proteína no estructural, altamente conservada entre los Pestivirus, la autoproteólisis es la función hasta ahora mejor estudiada en esta proteína; mediante esta función abandona al resto de las proteínas estructurales, las cuales van a ser catalizadas en su gran

mayoría por proteasas celulares; la siguiente proteína es una proteína estructural denominada C, ya que codifica para la nucleocápside del virión, es un polipéptido de 14 KDa; el siguiente segmento lo ocupa la glicoproteína E^{ns} es una proteína altamente glicosilada; bajo estudios de recombinación, esta proteína muestra un fuerte reconocimiento con receptores celulares, probablemente vía interacción con los glicosaminoglucanos; esta proteína también ha mostrado tener actividad de ribonucleasa, no se ha descrito exactamente la función de esta ribonucleasa, solo se ha mencionado que interviene en algunos aspectos del ciclo de vida del virus, algunos estudios con anticuerpos anti ribonucleasa neutralizan la infectividad del virus y las mutaciones en esta proteína que destruyen la actividad de la ribonucleasa hace a los virus más citopáticos en cultivo, otras propiedades que se han descrito de esta proteína son los efectos tóxicos de linfocitos *in vitro*, lo cual podría incrementar la leucopenia que se observa en infecciones naturales; las últimas proteínas estructurales son E1 y E2, ambas son proteínas integrales de la membrana y contienen sitios de glicosilación, intervienen en la interacción con las células para iniciar el proceso infectivo del virus. Posteriormente se encuentran las proteínas no estructurales (NS); la primera de ellas es una proteína pequeña denominada p7, se ha considerado que esta proteína interviene en la producción de virus infectantes, pero no en la replicación del genoma; la proteína NS2-3 de 125 KDa, es una proteína que tiene una porción de señalamiento de proteasa y se encuentra como una proteína madura dividida solo en algunas cepas citopáticas (cp) del BVDV, la función de esta proteína no es del todo conocida pero algunos

estudios indican que es indispensable para la replicación del RNA, además el NS3 del complejo tiene actividad de proteasa, esta función requiere a la proteína NS4 como cofactor; las proteínas hidrofóbicas NS4A y NS4B, pueden estar actuando solas, es decir, ya maduras y divididas o bien en complejo, la función estrictamente no se ha relacionado pero se reconocen las funciones de cofactor en proteasas dependientes de serina; las últimas proteínas de la poli proteína son el NS5A y el NS5B, la primer proteína se encuentra ligada a propiedades de una enzimas que actúa en la fosforilación, la proteína NS5B se relaciona con actividades de polimerasa dependiente de RNA, esta actividad se promociona por la concentración de GTP en el medio (Lindenbach, B.D.,2001; Thiel, H.J.; 2000).

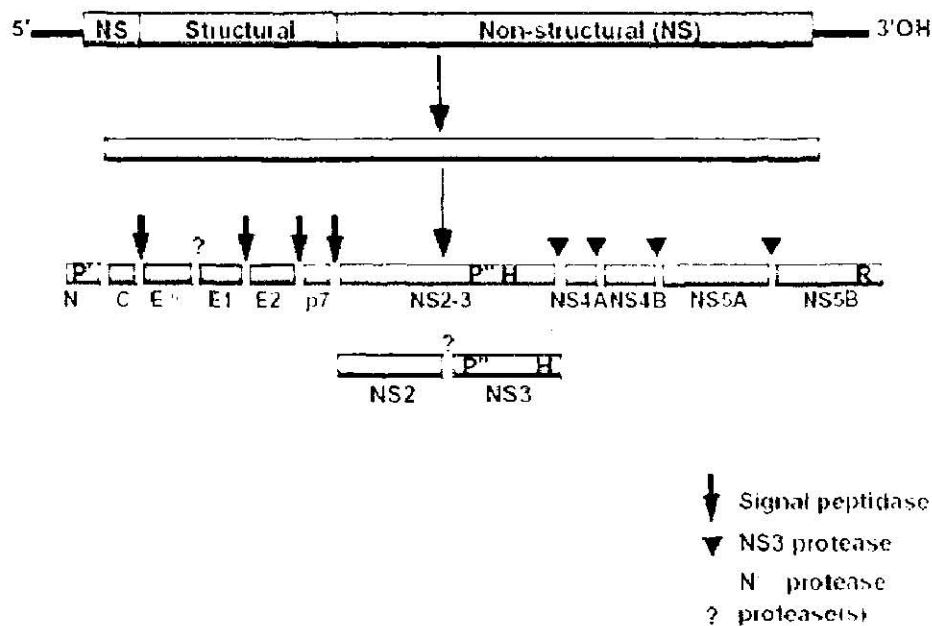


Figura 1. Organización del Genoma de los Pestivirus y el procesamiento de la poli proteína (Thiel, H.J.; 2000)

Los viriones miden de 40 a 60 nm de diámetro y tienen forma esférica, la envoltura mide de 10 a 12 nm. La infectividad del virión es reducida a temperaturas por encima de 40°C, los solventes orgánicos y detergentes rápidamente inactivan el virus.



Figura 2. Microfotografía electrónica de contraste negativo de partículas del Virus de Diarrea Viral Bovina-1 (BVDV-1) (Thiel, H.J.; 2000)

Las especies del BVDV, son clasificadas en cepas citopáticas (cp) y cepas no citopáticas (ncp); esta clasificación se establece por los efectos de estas en cultivos celulares, a esta clasificación se le denomina biotipo de las cepas de BVDV. Algunos estudios indican que las cepas ncp son más frecuentes en infecciones de campo que las cepas cp, en un estudio realizado con 105 animales analizados mediante métodos moleculares, se identificaron 69 animales con infecciones en donde predominaban las cepas ncp; mientras que el resto de los animales estaban infectados con la cepa citopática. Esta última generalmente se aísla en casos de enfermedad de las mucosas, que ocurre en los animales con infecciones

persistentes, esta cepa se aísla junto con un ncp, formando lo que se conoce como "virus par" (Fulton, R.W., 2003; Tautz, N.; 1999).

La segunda clasificación, corresponde al genotipo de las cepas del BVDV; esta clasificación se basa en la comparación de las secuencias genéticas altamente conservadas entre especies del género y aquellas secuencias que varían entre las cepas de una especie; las nuevas cepas que van a ser ubicadas por comparaciones de secuencias genéticas deben de ser estables, distintas, y además se debe establecer la antigencidad, la virulencia y tener en cuenta el área geográfica de donde se aisló. De esta forma se han identificado nuevas especies y subespecies en el género, dentro de las relacionadas con el BVDV, se encuentran el BVDV-1 y el BVDV-2; así como, sus subespecies para cada uno, identificándose como, 1a, 1b y 2a, 2b. Entre estas dos especies de BVDV se encuentran diversas semejanzas, dentro de las cuales, se mencionan las siguientes; las infecciones en animales adultos con cualquiera de los dos genotipos cursan generalmente con signos leves o bien son inaparentes, las cepas de ambos genotipos pueden ser citopáticas y no citopáticas, las cepas no citopáticas de cualquiera de los genotipos pueden establecer una infección persistente; la diferencia biológica más significativa entre los dos genotipos es la antigenicidad de sus cepas; esto se puede medir mediante el uso de anticuerpos monoclonales, originalmente dirigidos contra una genotipo y probados en otro; obteniendo así un porcentaje de reacción antigénica; algunos estudios arrojan que los anticuerpos monoclonales anti-BVDV2, usados en cepas de BVDV1 forman un porcentaje de reacción bajo, comparados con los anticuerpos

monoclonales anti-BDVD1, que forman más interacciones con cepas de BVDV2; probando así que los antígenos de superficie de las cepas BVDV2 usadas en este estudio al menos, son mucho más específicos, comparados con los antígenos de superficie de las cepas BVDV1 (Ridpath, J.F.; 2003).

2.4.2.1 Replicación Viral

El proceso se inicia con una endocitosis mediada por la interacción entre receptores de la superficie celular y sus ligandos en las glicoproteínas virales E^{gns} y E2, después de este proceso y el desensamblaje de la envoltura, el virus sirve como un ARNm. La traslación inicial ocurre por acciones del Sitio Interno de Entrada Ribosomal (IRES), que se localiza en el 5' UTR del ARN. El procesamiento de la poli proteína ocurre al momento de la traslación y después de este proceso por la intervención de proteinasas celulares y virales. La proteína N^{pro} se autoproteoliza removiéndose del resto de la poli proteína, posteriormente se inicia la separación de las proteínas estructurales mediante la acción de peptidasas celulares. Las proteínas no estructurales también experimentan separación, en el caso particular de la proteína NS2-3, su separación depende del biotipo, ya que en los no citopáticos no se observa separación alguna; mientras que en los citopáticos existe una separación mediada por diferentes procesos como recombinaciones del genoma, inserciones genéticas, deleciones, duplicaciones de bases o secuencias, o bien por arreglos generales en el genoma, obteniendo un producto de NS2 y NS3. La actividad de la proteinasa de la proteína NS2-3 /NS3 interviene en la separación de las demás proteínas no estructurales. El proceso de replicación ocurre en

membranas intracitoplasmáticas en donde se forma el complejo de replicación, compuesto por el genoma viral y las proteínas no estructurales. Posteriormente los viriones maduran en vesículas intracelulares y salen de la célula por exocitosis (Thiel, H.J., 2005; Lindebach, B.D., 2001).

2.5 Modelos de Infección del BVDV

2.5.1 Infección Aguda

La afección ocurre con un periodo de incubación de 5 a 7 días, la sintomatología clínica generalmente se manifiesta con: fiebre, leucopenia, depresión, anorexia, descarga oculonasal, erosiones orales, úlceras, diarrea y disminución de la función productiva, la viremia frecuentemente ocurre en los 15 días posteriores a la infección. La morbilidad y mortalidad de este estado depende de la gravedad de los signos, aunque se estima un valor de 10 a 30 %; la infección aguda se presenta comúnmente por el daño ocasionado a los epitelios respiratorios, gastrointestinal y tegumentario. Los antígenos virales se pueden encontrar en el epitelio de la lengua, esófago, bazo, tonsilas, criptas intestinales, bronquios, placas de Peyer, y de la piel. El diagnóstico diferencial en animales adultos, se centra en salmonelosis, diarrea de invierno, enfermedad de Johne, parásitos intestinales, fiebre catarral maligna, intoxicación con arsénico y deficiencia de cobre; la signología respiratoria se puede confundir con pasterelosis, salmonelosis, hemofilosis, infección por mycoplasmas, y por el virus sincitial respiratorio.

En machos con afecciones de esta índole, se puede aislar el virus de glándulas accesorias, testículos y semen, esto último puede o no estar relacionado con descensos repentinos en la calidad, aunque algunos autores han reportado baja motilidad y anormalidades de las células espermáticas, sobretodo cuando la infección está en apogeo. (Fray, M.D.; 2000).

En las hembras el virus se puede obtener de oviducto, endometrio, de ovario; dentro de este se han aislado partículas virales de células de la granulosa, de la teca, así como de líquido folicular, diferentes autores reportan una hipoplasia ovárica en las hembras PI, reducción del crecimiento folicular en animales inmunocompetentes que experimentan una afección aguda, las infecciones del ovario pueden ser muy prolongadas, en condiciones experimentales se ha encontrado el virus hasta 60 días después del desafío, se ha sugerido que la leucopenia que experimentan las hembras influye sobre el ciclo folicular normal, ya que estas células son vitales para el proceso antes descrito. (Fray, M.D.; 2000; Bukulmez, O., 2000).

Durante la infección aguda el virus invade las células endometriales, disminuyendo la implantación del embrión, originando así la muerte embrionaria, infertilidad y retorno del estro, cuando la infección ocurre en días o meses después de la implantación, el virus penetra las células del placentoma, replicándose en ellas, causando daño en el endotelio vascular, produciéndose el aborto, momificación y muerte fetal; si bien el biotipo del virus determina la pauta del resultado de la infección aguda, ya que los virus ncp antes de los 125 días

aproximadamente; tiempo en el cual el sistema inmune del feto todavía no es competente, desencadenan una infección persistente en el feto. Las infecciones dentro de los 150 a 200 días de gestación desencadenan en malformaciones del feto, tales como hidrocefalia, hipoplasia cerebelar, hipomielinogénesis, microftalmia, cataratas, atrofia o displasia retinal, hipotricosis, braquignata, anormalidades esqueléticas, disminución del crecimiento e hipoplasia pulmonar(Grooms, D.; 2002)

2.5.2 Infecciones Persistentes

Este tipo de infección se lleva acabo por un virus de biotipo no citopático, el tiempo en el que se realiza es entre los 90 y 120 días de gestación. La capacidad del biotipo de causar inmunosupresión, está relacionado con el tropismo del virus hacia las células presentadoras de antígenos, en estudios experimentales se observó que este biotipo prolifera con mayor eficiencia en monocitos que en células dendríticas, además en las primeras reduce muchas de sus funciones en la inmunidad adquirida. Otros mecanismos observados en la inmunosupresión del biotipo ncp es la capacidad de bloquear la inducción de interferones $\alpha\beta$. (Brackenbury, L.S.; 2003). La supervivencia de los animales PI generalmente es baja, ya que están propensos a presentar en cualquier momento la enfermedad de las mucosas (Grooms, D.; 2002).

2.5.3 Enfermedad de las Mucosas

Esta enfermedad es reportada como una enfermedad esporádica en bovinos y ocurre entre los 6 y 2 años de vida de los animales que desarrollaron

una infección persistente con una cepa no citopática en el primer trimestre de la gestación. En situaciones agudas, la enfermedad tiene un periodo de incubación de 10 a 14 días después de la exposición y los signos tienen un patrón de fiebre bifásica, anorexia, taquicardia, polipnea, diarrea acuosa profusa, ocasionalmente con estrías de sangre y un olor fétido; se presentan además erosiones en la mucosa oral, lengua, paladar; así como, en el espacio interdigital, pezones, y la vulva; las erosiones se caracterizan por ulcerativas y diftéricas; otros signos de importancia son las descargas nasales y de la cornea, opacidad de la misma, salivación excesiva, timpanismo y movimientos ruminales bajos. Los signos de la enfermedad crónica son aún más ambiguos y conservan el patrón de afección general, con algunas excepciones tales como alopecia, erosiones interdigitales; además de la anemia, neutropenia y trombocitopenia persistente; se dice que los animales afectados no sobreviven más de 18 meses y mueren por una debilidad generalizada.(Grooms, D., 2002; Tautz, N.,1998)

2.6 Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo de la infección por BVDV puede en determinado momento establecerse de acuerdo a la historia y signos clínicos del animal o del hato afectado. Sin embargo, esta alternativa no es precisa sobretodo debido a la multitud de síndromes clínicos que el virus puede inducir solo o en asociación con otros patógenos. Además los síntomas clínicos dependen de la cepa involucrada, edad, inmunidad contra el virus, estado fisiológico, la coinfección con otros agentes infecciosos y probablemente el estrés. El diagnóstico preciso de la

infección y su diferenciación dependen de análisis de laboratorio. Actualmente, se cuenta con diferentes procedimientos mismos que se pueden ubicar en dos grandes categorías: la detección indirecta mediante serología y la detección directa del virus. Cada método y categoría tiene ventajas, desventajas y aplicabilidad. Los factores que pueden influir en la eficiencia de un determinado procedimiento incluyen la diversidad genética y antigénica del virus, variaciones en la carga viral y la presencia de anticuerpos maternos (Goyal, S.M.; 2005). La detección serológica ha sido llevada a cabo mediante las técnicas de seroneutralización viral, inmunodifusión en agar gel, fijación del complemento, inmunofluorescencia indirecta, Inmunoelctrotransferencia (“western blot”) y el Inmunoensayo ligado a enzima indirecto (iELISA). La detección directa del BVDV ha sido llevada a cabo mediante el aislamiento viral, la detección de antígenos virales en tejidos y detección del genoma viral mediante RT-PCR y “Real Time PCR”. La herramienta diagnóstica a escoger debe estar ligada con el status sanitario que se desee alcanzar; ya que algunas de ellas son más específicas que otras. Además se deben tomar diferentes criterios para el muestreo, debido a que la interpretación de los resultados estará basada en los criterios tomados; es decir, el estatus de vacunación del hato, muestreo de una parte del hato, animales con problemas reproductivos evidentes, animales muy jóvenes. (Sandvik, T., 2005)

En las determinaciones serológicas es prescindible tomar en cuenta que los anticuerpos que se detecten pueden proceder de fuentes diferentes como: infecciones naturales, respuesta vacunal y anticuerpos colostrales; estos últimos

tanto en animales PI como en becerros no afectados en útero. Algunos autores han reportado que en animales PI los anticuerpos circulantes pueden durar hasta aproximadamente los tres meses de vida, ya que bloquean la cantidad de virus circulante, mientras que en los animales no PI, pueden durar hasta los ocho meses de vida; todo ello depende de la cantidad y calidad consumida (Sandvik, T., 2005). Diversos autores recomiendan tener animales centinelas en la ganadería y recomiendan que esos animales, se encuentren entre 6 y 8 meses de edad; ya que como se mencionó anteriormente los anticuerpos maternos han descendido y la seroconversión será causada por una infección natural; claro está que no deben ser vacunados. La detección de antígenos virales en tejidos generalmente no está relacionado con lesiones, sobretodo en los estados subclínicos y en persistentemente infectado, ya que en estos últimos se puede encontrar el antígeno en cualquier tejido y en los primeros se puede encontrar en leucocitos, suero, muestras de tejido. Los aislamientos virales se realizan en cultivos celulares, en los estados virémicos el virus se puede obtener de extractos de leucocitos, descargas nasales, pulmones, semen, sangre y órganos fetales. Las células en cultivo, pueden provenir de células bovinas diversas; no obstante las células de las turbinas (BT) y las MDBK han sido ampliamente usadas por la sensibilidad de estas a los efectos citopáticos del virus, lo que facilita la diferenciación entre un biotipo y otro. Otros puntos importantes a considerar son los nutrientes del cultivo celular como el suero bovino fetal (FBS) y el suero de ternero que son usados

continuamente y en la gran mayoría de los casos están contaminados con el virus, afectando la producción de biológicos y el diagnóstico. (Goyal, M.S., 2005).

En la detección del genoma viral, o parte de este, están inmiscuidas la técnica de RT-PCR y el "Real Time PCR"; la primera de ellas se ha descrito que es una prueba altamente sensible y es una de las técnicas actuales estándar para la detección del virus; para el desarrollo de esta técnica son importantes los oligonucleótidos, que son secuencias complementarias artificiales del genoma viral; y es de cuidado la selección y la síntesis de estos, debido a que el virus poseen secuencias nucleotídicas altamente variables (Ridpath, J.F.,2003). En estudios comparativos, sobre la sensibilidad de esta técnica, ELISA y el aislamiento viral, se encontró que el RT-PCR es más sensible que el aislamiento, mientras que ELISA es la menos indicada en este rubro; la estabilidad del ácido nucleico viral hace que esta técnica, sea mejor que el aislamiento, ya que es más complicado conservar el virus en su totalidad. En la técnica de "Real Time PCR", se minimizan las contaminaciones por el manejo de la muestra en la electroforesis, los puntos críticos en esta técnica son el diseño de sondas, marcadores fluorescentes y como en la técnica anterior el diseño y la síntesis de oligonucleótidos específicos. (Sandvik, T., 2005; Goyal, S.M., 2005).

3 Materiales y Métodos

3.1 Lugar de Realización de la Investigación

El trabajo de laboratorio se desarrolló en la Unidad Médica de Investigación Veterinaria (UMIV) y en el Laboratorio de Genética, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

3.2 Procedencia de las Muestras de Campo

Las muestras para su proceso provenían de hatos de Nuevo León localizados en los municipios de China, Los Herrera, Marín, Linares y Montemorelos. Todos los hatos analizados (5 hatos) son del sistema vaca-cría que no habían recibido vacuna contra el BVDV. El manejo practicado en ellos es el manejo típico de la región, dentro del cual se incluyen la desparasitación interna y externa y vacunación contra enfermedades telúricas. Los ranchos tienen antecedentes de bajos pesos al nacimiento, abortos y falla reproductiva como repetición de calores y aumento de intervalo entre partos, entre otros. No obstante, estos no fueron cuantificados para los propósitos del estudio. En ningún hato se cuenta con un programa de bioseguridad claramente establecido. La mayoría introduce animales de otras fuentes sin conocer su estatus con respecto a la infección por BVDV y todos practican la monta natural.

3.2.1 Colección y Manejo de Muestras

Se colectaron 73 muestras en total, las muestras consistieron en sangre venosa recolectada a partir de la vena coccígea con la ayuda de tubos al vacío y

agujas de doble filo (0.08 x 40 mm) estériles. Para obtener el suero, la sangre se captó en tubos sin anticoagulante de 7ml. La sangre con el anticoagulante EDTA 15% se colectó en tubos de 5 ml. Después de la toma de sangre las muestras fueron identificadas con el número del animal y rancho e inmediatamente colocadas en refrigeración para transportarse al laboratorio. La obtención de suero, plasma y paquete de leucocitos de cada animal fue realizada mediante centrifugación de ambos tubos a 3000 rpm durante 10 min^XY posterior succión con pipetas de plástico estériles de cada componente.

El suero, plasma y paquete leucocitario fueron colocados en tubos de plástico para microcentrifuga de 1.5 ml previamente identificados. Todas las muestras fueron colocadas a -20°C antes de su uso.

3.3 Análisis serológico de la infección por BVDV

Se analizaron todos los hatos para la presencia de anticuerpos anti-BVDV en una muestra de su población. La detección de anticuerpos contra BVDV fue realizada con un estuche comercial bajo el formato de ELISA indirecta (Bovine Virus Diarrhoea Virus [BVDV-Ab] SVANOVIR™, Svanova Biotech AB). La metodología así como la interpretación de los resultados fue bajo el protocolo recomendado por el fabricante. Se procesaron 73 muestras de igual número de animales distribuidos en todos los hatos.

3.4 Extracción del Ácido Ribonucleico (ARN)

Se extrajo ARN total de una parte del paquete leucocitario y plasma de muestras clínicas de los bovinos, de sobrenadante de cultivo de células infectada con la cepa NADL del BVDV-1 (Collett, M.S.; 1988), esta última empleada como control positivo, y agua tratada con DEPC (control negativo). Se usó un estuche comercial (Tri-Reagent® -RNA/DNA/PROTEIN ISOLATION REAGENT) según las recomendaciones del fabricante (Molecular Research Center, Inc.). El proceso se inició con medidas de descontaminación en la campana de extracción de ARN (ver Apéndice), posteriormente se mezcló 750 µl de Tri-Reagent® (Fenol + Tiocianato de Guanidina) con 150µl de plasma y 100µl de paquete leucocitario (relación 3:1) en un tubo para microcentrifuga de plástico estéril de 1.5ml, esta mezcla se agitó por espacio de 3 a 5 segundos en un agitador eléctrico. Después de la agitación los tubos fueron incubados entre 22 y 25°C durante 5 minutos. A cada tubo se le agregó 200µl de Cloroformo y se agitó durante 15 segundos, después se volvió a incubar a la misma temperatura de cuarto durante 15 minutos. Una vez realizado lo anterior, los tubos fueron centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. Terminada esta última fase se puede observar la separación de tres estratos en el tubo centrifugado, la fase superior (sobrenadante) es donde se encuentran suspendido el ARN total de la muestra, mientras que en las capas inferiores (interfase y orgánica) restos de ADN y proteína. La fase acuosa superior se extrajo con cuidado de no alterar la capa de la interfase. Se obtuvieron en promedio cerca de 500µl del sobrenadante y se colocó en un tubo para microcentrifuga estéril de

1.5 ml. Para precipitar el ARN a cada tubo se le agregó 500 μ l de Isopropanol y se dejó incubando a temperatura de cuarto durante 10 minutos. Después cada tubo fue centrifugado a 12000g durante 8 minutos a 4°C, después de esta última se observa una pastilla blanca en fondo del tubo. El exceso de isopropanol fue removido con la ayuda de una micropipeta y con cuidado de no succionar la pastilla. Después, con el propósito de "lavar" la pastilla, al tubo se le adicionó 1ml de etanol al 75%. Se volvió a centrifugar a 8000g por 5 minutos a 4°C. Después, se removió el exceso de etanol y enseguida cada tubo fue dejado por espacio de 3-5 minutos a temperatura de cuarto 22-25°C, pero se evitando que la pastilla se seque por completo. Finalmente, la pastilla obtenida (ARN) fue disuelta en 30 μ l de agua DEPC. Cada tubo fue etiquetado y almacenado a -40°C hasta su uso.

3.5 Protocolo de RT-PCR para Pestivirus

3.5.1 Dilución de Iniciadores

Los iniciadores utilizados en el estudio fueron el OL100 "forward" (5'-CAT GCC C(AT) (CT) AGT AGG ACT AGC-3') y el OL380R "reverse" (5'-AAC TCC ATG TGC CAT GAT CAG-3'), ambos reconocen secuencias de nucleótidos altamente conservadas dentro del genero *Pestivirus*, los dos iniciadores se alinean dentro de la región 5'UTR (Becher, P; Orlich, M.; Thiel H.J.; 1998). Los iniciadores fueron sintetizados por la compañía MWG-Biotech (MWG-Biotech, Inc. High Point, NC, USA). Cada uno fue diluido en el vial original a razón de 100pmol/ μ l utilizando agua DEPC. Posteriormente se subdividieron en alícuotas de trabajo de 50 μ l a una concentración de 10pmol/ μ l.

3.5.2 Programa de Termociclador

La programación del termociclador para llevar a cabo la reacción de transcripción en reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en un solo paso fue según el protocolo publicado por Avalos, R.R. (Avalos, R. R. 2002). En el cuadro 2, se describen las condiciones para cada una de las fases, así como la temperatura y tiempo de cada paso.

Cuadro 2. Programa del termociclador para RT-PCR de secuencias de *Pestivirus*.

Fase ^(*)	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
RT ^(*)	1. Activación Enzimática	50	30min
	2. Inactivación Enzimática	94	2min
PCR ^(*)	1. Desnaturalización	92	20seg
	2. Apareamiento de Iniciadores	55	30seg
	3. Extensión	72	35seg
	Extensión Final	72	5min
M ⁽⁺⁾	Mantenimiento	4	24H

(*) Las fases RT y M duran un ciclo, la del PCR 40 ciclos. †Transcriptasa reversa, ★Reacción en Cadena de la Polimerasa, + Mantenimiento.

3.5.3 Condiciones de RT-PCR

Este procedimiento fue realizado con la ayuda del estuche comercial "SuperScript™ II One-Step RT-PCR System With Platinum® Taq DNA Polymerase" de la compañía Invitrogen™. Este estuche contiene una mezcla de buffer "2X Reaction Mix", las enzimas transcriptasa reversa (RT) y la Taq polimerasa

“SuperScript™ II RT/ Platinum® Taq Mix”. En la reacción del RT-PCR, se incluyó un inhibidor de RNAsas (RNaseOut™, Invitrogen™) no contemplado en el estuche usado. El protocolo se inició con un periodo de limpieza y descontaminación en la “campana de PCR”(ver Apéndice) y el mantenimiento de los reactivos en un ambiente frío (4 a 6° C) mediante el uso de una hielera de trabajo. Se procedió a la elaboración de una mezcla de reactivos para RT-PCR en un tubo de microcentrifuga de 1.5ml de plástico, el orden de mezclado fue el siguiente: primero se colocaron 12.75 µl de agua tratada con DEPC, posteriormente se agregaron 25 µl “2X Reaction Mix”, después se añadieron 3 µl de iniciador OL100 [10pmol/ µl] y 3 µl de iniciador OL380R [10pmol/ µl], paso seguido se incorporó .25 µl de inhibidor de RNAsas, así como 1 µl de “SuperScript™ II RT/ Platinum® Taq Mix”, estas cantidades se usaron para una sola muestra, por lo que es necesario multiplicarlas por el factor “n” muestras + 1, con el objetivo de reducir el error en el pipeteo y el uso de pipetas mal calibradas. Posteriormente de esta mezcla se tomaron 45 µl y se pasaron en tubos para PCR de plástico de 0.2ml previamente identificados con el número del animal y la fecha, a estos tubos se les agregó finalmente el ARN correspondiente, mezclando este último mediante pipeteo con los 45 µl previamente colocados en este tubo, para tener un volumen total de 50 µl. Después se transportaron en la hielera de trabajo desde la campana de PCR al termociclador para que se llevara a cabo el procedimiento de RT-PCR.

3.6 Protocolo de RT-PCR y snPCR para BVDV-1

3.6.1 Dilución de Iniciadores para RT-PCR

Los iniciadores utilizados en este diseño fueron el OL100 descrito previamente (Becher, P; Orlich, M.; Thiel H.J.; 1998) y los iniciadores BVDV1a (5'-GCC CYT TGC TGT TAC CCG T-3') y el BVDV1b (5'-GTC CTY TGC TAT TGC CTA A-3'). Estos últimos reconocen una secuencia dentro del gen N^{pro} y fueron usados como "reverse". El juego de estos iniciadores amplifican un producto de tamaño esperado de cerca de 524bp (Cedillo, R. S.; 2004). Los iniciadores fueron sintetizados por la compañía MWG-Biotech (MWG-Biotech, Inc. High Point, NC, USA), previo envío de la secuencia vía electrónica, y fueron diluidos en su vial original a una concentración final de 100pml/ μ l. Posteriormente se distribuyeron en alícuotas de trabajo de 50 μ l a una concentración de 10pml/ μ l. Todas las diluciones fueron hechas con agua tratada con DEPC.

3.6.2 Programa de Termociclador para RT-PCR

El protocolo de programación para realizar la RT-PCR en un solo paso, como primer requisito de amplificación de las cepas de BVDV-1, fue adaptado de previos experimentos reportados por Cedillo, R. S. (Cedillo, R. S.; 2004); estos se sintetizan en el cuadro número 3.

Cuadro 3. Programa de Termociclador para RT-PCR de BVDV-1.

Fase ^(*)	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
RT ^(*)	1. Activación Enzimática	50° C	30min
	2. Inactivación Enzimática	94°C	2min
PCR ^(*)	1. Desnaturalización	94°C	30seg
	2. Apareamiento de Iniciadores	55°C	30seg
	3. Extensión	72°C	30seg
	Extensión Final	72°C	5min
M ^(*)	Mantenimiento	4°C	24H

(*) Las fases RT y M duran un ciclo, la del PCR 40 ciclos. [△] Transcriptasa reversa, [★] Reacción en Cadena de la Polimerasa, [†] Mantenimiento.

3.6.3 Condiciones de RT-PCR

Las condiciones establecidas para este protocolo, son semejantes a las ejecutadas para el RT-PCR de *Pestivirus* descritas en el punto 3.5.3, aunque existen algunas diferencias reportadas en el cuadro número 4.

Cuadro 4. Condiciones de RT-PCR para BVDV-1

Orden de Mezclado	Componente	Cantidad (µl)
1	Agua DEPC	9.75
2	2X Reaction Mix	25
3	OL100 [10pmol/ µl]	3
4	BVDV1a R(10pmol/ µl)*	3
5	BVDV1b R (10pmol/ µl)*	3
6	RNAse Inhibitor	0.25
7	SuperScript™ III RT/ Platinum® Taq Mix	1
8	ARN	5
	Total	50

* Iniciadores solo empleados en el RT-PCR para BVDV-1

En el procedimiento de RT-PCR para BVDV-1, utilizando los iniciadores OL100, BVDV1aR y BVDV1bR; se espera obtener un tamaño de banda relativamente grande de 524 bp. En la mayoría de las ocasiones en muestras clínicas y bajo las condiciones del presente trabajo no fue posible evidenciar esta banda en geles de agarosa o poliacrilamida. Debido a esta situación se decidió hacer un PCR de tipo semi-anidado (snPCR), utilizando el producto del RT-PCR para BVDV-1 como templado. El producto esperado en el snPCR es de cerca de 244bp (ver adelante). Las condiciones para la snPCR, el programa de termociclador y los iniciadores utilizados, se describen en los siguientes puntos.

3.6.4 Dilución de Iniciadores para snPCR.

Los iniciadores empleados en esta técnica fueron el OL380 (5'-CTC TAC ATG GCA CAT GGA GTT-3'), el BVDV1a R (5'-GCC CYT TGC TGT TAC CCG T-3') y el BVDV1b R (5'-GTC CTY TGC TAT TGC CTA A-3') reportados por Cedillo, R. S. (Cedillo, R.S. 2004). La síntesis de estos fue llevada a cabo por la compañía MWG-Biotech (MWG-Biotech, Inc. High Point, NC, USA), los iniciadores fueron diluidos en su vial original con agua tratada con DEPC, para tener una concentración final de 100pm/μl, realizándose posteriormente alícuotas de 50μl a una concentración de 10pml/μl, también diluidos con agua tratada con DEPC.

3.6.5 Programa de Termociclador para snPCR.

El programa de termociclador empleado para el n PCR, fue adaptado de los ensayos conducidos por Cedillo, R. S. (Cedillo, R. S.; 2004); con ligeros cambios en los tiempos principalmente, estos se sintetizan en el cuadro número 5.

Cuadro 5. Programa de Termociclador para snPCR de BVDV-1.

Fase	Paso	Temperatura °C	Tiempo
snPCR ^(*)	1. Desnaturalización	94	30seg
	2. Apareamiento de Iniciadores	55	30seg
	3. Extensión	72	30seg
	Extensión Final	72	5min
M ⁽⁺⁾	Mantenimiento	4	24H

(*) La Fase del n PCR se prolonga por 30 ciclos, mientras que (+) La Fase de Mantenimiento solo se prolonga por un ciclo.

3.6.6 Condiciones de snPCR.

Para el desarrollo de esta técnica se utilizaron reactivos de PCR de la compañía BIOLINE®. el procedimiento comenzó con las medidas de descontaminación rutinarias y requeridas en una campana de PCR (ver Apéndice), así como el mantenimiento de los reactivos en un ambiente frío (4 a 6° C) mediante el uso de una hielera de trabajo; para poner a punto la técnica se siguieron las recomendaciones del fabricante, estas en general se refieren a las concentraciones estándares para trabajar, en el experimento se hicieron ligeros cambios en la técnica para que las secuencias amplificadas se apreciaran adecuadamente, el proceso se inició con la elaboración de una mezcla de reactivos para el snPCR, la cual se realizó en tubos de microcentrífuga de plásticos de 1.5

ml, en primera instancia se utilizó 34.6µl de agua tratada con DEPC, 5 µl de Buffer al 10x (lista para usarse), 2 µl de una mezcla previamente preparada de dNTP's a una concentración de trabajo de 5mM, 1.5 µl de MgCl₂ al 50mM (lista para usarse), 3 µl de iniciador OL380 previamente diluidos a 10 pmol/ µl, así como 3 µl de BVDV1a R y 3 µl de BVDV-1b R, diluidos a la misma concentración que el iniciador OL380, 0.5 µl de Taq DNA polimerasa a una concentración de 5U/ µl (lista para usarse); lo referido a "listo para usarse", ya se encuentra a la concentración requerida para la técnica en el estuche de PCR de la compañía. De la mezcla para snPCR se obtuvieron 47.5 µl, mismos que fueron colocados en tubos de PCR de plástico con un capacidad de 0.2ml, previamente identificados con el "genotipo", número de animal y la fecha. A dichos tubos posteriormente les fue agregado 2.5 µl del producto del RT-PCR para BVDV-1 (cDNA), previamente obtenido. Las cantidades especificadas para la mezcla de los reactivos, descritas anteriormente, están calculadas para una sola muestra por lo que será necesario multiplicar esos valores (cada uno de ellos) por "n" cantidad de muestras más una, para evitar errores al pipetear y por el efecto del mal calibrado de las pipetas empleadas. Una vez colocado el templado se debe asegurar una mezcla uniforme con los reactivos previamente depositados en los tubos de PCR. Una vez depositado el último componente bajo campana, los tubos (mantenidos en hielo) fueron colocados sin demora en el termociclador.

3.7 Protocolo de snPCR para BVDV-2

3.7.1 Dilución de Iniciadores

Los iniciadores utilizados en este experimento fueron el BVDV5a (5'-CAC TCC ATT AGT YGA GGA G-3'), BVDV5b (5'-CGC TCT GGC AAC AAG AGA G-3'), BVDV5c (5'-CGC TCT GGC AAT RCA AGA G-3'), como "forward" (Arias, P.; 2003); todos estos iniciadores reconocen secuencias genéticas dentro de la región 5' UTR; y el OL380R (5'-AAC TCC ATG TGC CAT GAT CAG-3') como "reverse" el cual se alinea en la parte final del 5' UTR (Becher, P; Orlich, M.; Thiel H.J.; 1998). Los iniciadores fueron sintetizados por la compañía MWG-Biotech (MWG-Biotech, Inc. High Point, NC, USA), se diluyeron con agua tratada con DEPC, en su vial original para tener una concentración final de 100pml/ μ l, realizando posteriormente alícuotas de 50 μ l a una concentración de trabajo de 10pml/ μ l.

3.6.2 Programa de Termociclador

Las condiciones para las temperatura y tiempos del snPCR, fueron tomados de los trabajos de Arias, P. (Arias, P.; 2003) y de Cedillo, R.S. (Cedillo, R. S.; 2004), empero se realizaron ligeras modificaciones en los tiempos del snPCR. Las condiciones empleadas se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Programación del Termociclador para el snPCR de BVDV-2.

Fase	Paso	Temperatura (° C)	Tiempo
snPCR ^(*)	1. Desnaturalización	92°C	20seg
	2. Apareamiento de Iniciadores	55°C	30seg
	3. Extensión	72°C	35seg
	Extensión Final	72°C	5min
M ⁽⁺⁾	Mantenimiento	4°C	24H

(*) La Fase del n PCR se prolonga por 30 ciclos, mientras que (+) La Fase de Mantenimiento solo se prolonga por un ciclo.

3.7.3. Condiciones del snPCR para el BVDV-2

Para el desarrollo de esta técnica se utilizó el mismo estuche de PCR descrito en el punto 3.6.6, también se siguió el procedimiento general de la técnica enfatizada en dicho punto; solo se modificaron los iniciadores y el templado. En este experimento se utilizó el producto obtenido de los iniciadores OL-100 y OL380R del RT-PCR para *Pestivirus*. Subsecuentemente, se usaron los iniciadores BVDVSa, BVDVSb y BVDVSc para detectar y diferenciar la presencia de BVDV-2, estos iniciadores reconocen sitios internos (alrededor de las bases 217-237, cepas 890 y C413 del BVDV-2) del producto obtenido entre OL-100 y OL380R. El orden de mezclado y los reactivos utilizados en esta técnica se observan en el cuadro 7.

Cuadro 7. Condiciones para el snPCR de BVDV-2.

Orden de Mezclado	Componente	Cantidad (µl)
1	Agua DEPC	34.6
2	Buffer 10X	5
3	dNTP (5mM)	2
4	MgCl ₂ (50mM)	1.5
5	OL380R (10pmol/ µl)	3
6	BVDVSa (10pmol/ µl)	3
7	BVDVSb (10pmol/ µl)	3
8	BVDVSc (10pmol/ µl)	3
9	Taq DNA pol (5U/ µl)	0.5
10	cDNA del RT-PCR para Pestivirus [#]	2.5
	Total	50

Templado solo usado en snPCR para BVDV-2

3.8 Verificación de productos amplificados

El término productos amplificados se refiere al resultado final de la extracción del ARN, del RT-PCR para *Pestivirus* y para BVDV-1, así como para el snPCR de BVDV-1 y BVDV-2. La verificación se realizó tanto en geles de agarosa como de poliacrilamida. Este último, se llevó a cabo cuando los productos de RT-PCR no presentaban la suficiente nitidez o se dificultaba su apreciación en los geles de agarosa. La preparación de estos geles y el protocolo de corrimiento electroforético se describen en el Apéndice.

4 Resultados

4.1 Serología contra BVDV en los hatos estudiados.

En ninguno de los hatos estudiados se practica la vacunación contra el virus de la diarrea viral bovina. La última introducción de animales al hato sucedió mínimo un año antes del muestreo para el presente trabajo. En ninguno de los hatos se cuentan con medidas de bioseguridad adecuadas, no se practica la cuarentena, ni se solicitan pruebas libre de enfermedad (con excepción de Brucelosis y Tuberculosis). Todos los hatos resultaron seropositivos. El porcentaje de animales seropositivos frente al BVDV fue relativamente alto con 48.6%. Los rangos de seropositividad variaron desde 28.5 hasta 67.8%. En el cuadro número 8, se muestran estos parámetros así como la cantidad de animales por hato, la proporción de muestreados y positivos a ELISA. Dado la ausencia de vacunación en estas poblaciones y a la carencia de bioseguridad, se asumió que en estos hatos el BVDV se encuentra circulando en ellos.

Cuadro 8. Relación de la seropositividad frente a BVDV en Hatos bovinos del Estado de Nuevo León, con falta de vacunación contra BVDV.

<i>Rancho</i>	<i>Animales en el hato</i>	<i>Muestreados</i>	<i>ELISA (+)</i>	<i>Seropositivos (%)</i>
1	55	15	6	40.0
2	69	14	6	42.8
3	40	7	2	28.5
4	43	10	3	30.0
5	104	27	19	67.8
Total	311	73	36	$\bar{x} = 48.6$

4.2 Obtención y calidad de ARN total

Aunque no fue posible medir la concentración de ARN total obtenida, el protocolo seguido en el presente trabajo nos permitió obtener ARN en concentraciones suficientes para realizar el RT-PCR directamente a partir de la mezcla de una fracción rica en leucocitos y plasma. En la figura 3 se presenta una muestra de los corrimientos electroforéticos de 6 μ l ARN, hechos en geles de agarosa y poliacrilamida y después de teñir con bromuro de etidio. Además de lo anterior, se asumió que la calidad del ARN fue la adecuada dado que fue posible obtener productos del RT-PCR a partir de sobrenadante de cultivos celulares infectados con la cepa NADL usados como controles positivos (datos no mostrados) y , así como de las muestras clínicas sospechosas.

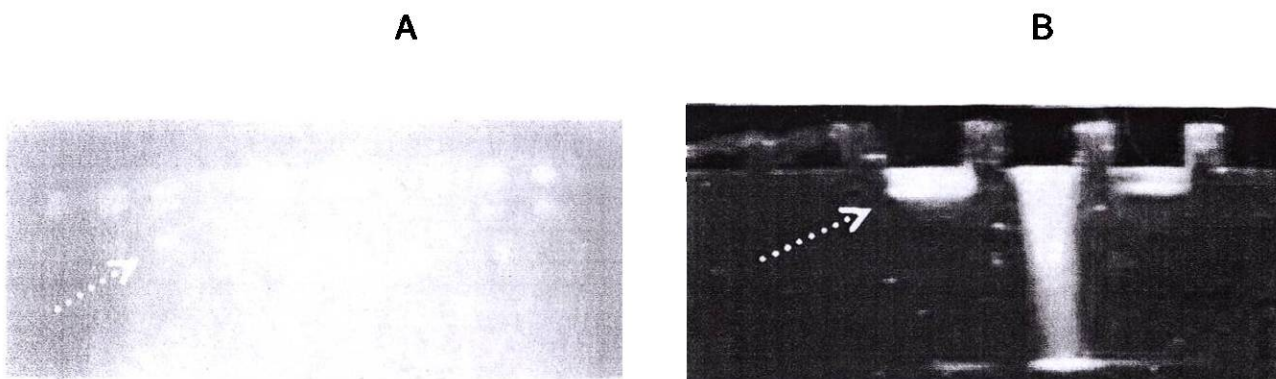


Figura 3: Verificación de extracción de RNA (Flechas) de muestras de campo, en un gel de Agarosa al 1.8% (A) y poliacrilamida al 9% (B). La preparación de los geles y el protocolo de corrimiento electroforético se describe en el apéndice.

4.3 Detección de Pestivirus en muestras clínicas

Un total de 73 animales fueron procesados para la búsqueda de secuencias de pestivirus en sangre circulante. De los cuales 25 resultaron positivos con el uso

de iniciadores "universales" que amplifican todos los BVDV y otros pestivirus reportados a la fecha. La positividad al RT-PCR y la relación con el análisis serológico de cada animal y por hato se muestra en el cuadro número 9. En las figuras 4 y 5 se muestra una parte de los positivos obtenidos bajo el protocolo trabajado.

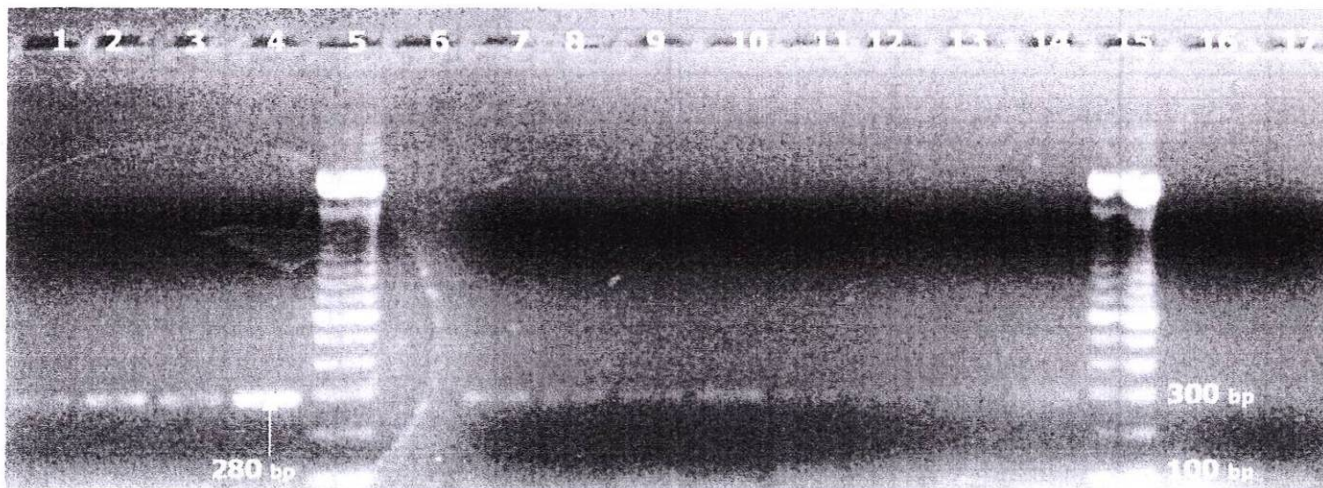


Figura 4. RT-PCR para *Pestivirus* en gel de agarosa al 1.8%; carriles 1-3,7-14 y 16-17 son muestras de campo; carril 4 es el control positivo, carril 5 y 15 marcador de peso molecular de 100 bp, carril 6 control negativo

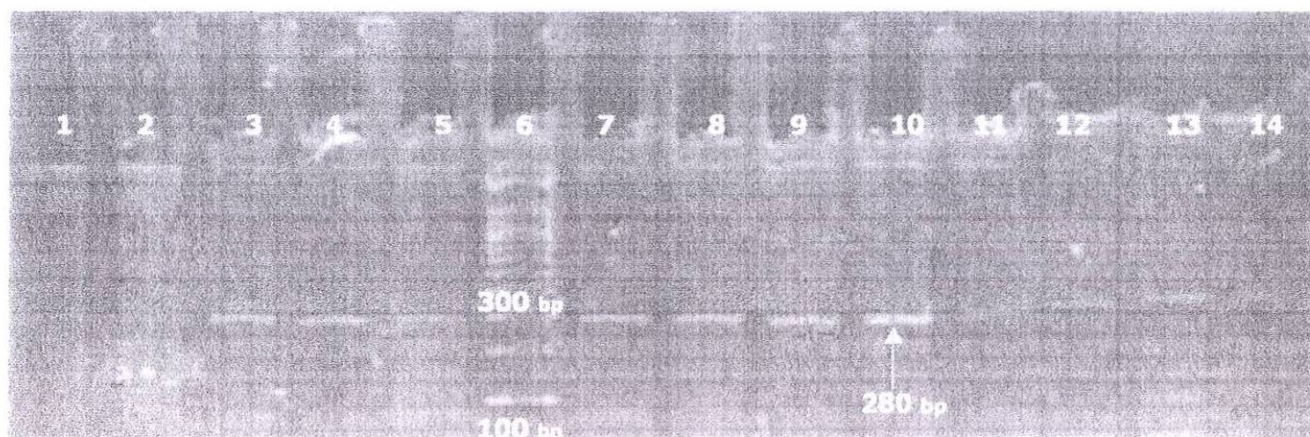


Figura 5. RT-PCR para *Pestivirus* en gel de poliacrilamida al 9%; carril 1 control negativo, carril 2-5 muestras de campo, carril 6 marcador de peso molecular de 100bp, 7-9 muestras de campo, carril 10 control positivo, carril 11-14 muestras de campo

Cuadro 9. Relación entre reacción serológica y la detección de secuencias de *Pestivirus* en muestras clínicas de bovinos.

Hato	Animal	ELISA	Pestivirus	BVDV-1	BVDV-2
1	1	+	-		
	2	-	+		+
	3	-	-		
	4	+	-		
	5	+	+		+
	6	+	+	+	
	7	-	+		+
	8	-	-		
	9	-	-		
	10	-	-		
	11	-	-		
	12	+	-		
	13	-	-		
	14	+	-		
	15	-	-		
2	1	+	-		
	2	-	+		+
	3	-	+		+
	4	-	+		+
	5	+	-		
	6	+	-		
	7	-	-		
	8	-	+		+
	9	+	+	+	
	10	-	-		
	11	+	+	+	
	12	-	+	+	
	13	+	+	+	
	14	-	+	+	
3	1	-	+	+	
	2	+	+	+	
	3	-	-		
	4	+	-		
	5	-	-		
	6	-	-		
	7	-	-		
4	1	+	+	+	
	2	-	-		
	3	-	-		
	4	-	-		
	5	+	-		
	6	-	-		
	7	-	-		
	8	+	-		
	9	-	-		
	10	-	-		
5	1	+	-		
	2*	-	+	+	
	3	+	-		
	4	+	-		
	5	+	-		
	6	+	-		
	7	+	-		
	8	+	-		
	9	+	-		
	10	+	+		
	11	+	-		
	12	+	-		
	13	-	+		
	14*	-	+	+	
	16	+	-		+
	17	+	-		
	18	+	-		
	19*	-	+		+
	20	-	+		
	21	+	-		
	22	-	+		
	23	+	-		
	24	-	+		
	25	+	-		
	26	-	+		
	27	+	+		

* Animales considerados PI, nótese la seronegatividad frente al BVDV

4.4 Genotipificación de los productos amplificados

En este apartado debido a situaciones económicas solo fue posible trabajar con una subpoblación de 19 animales para ambos genotipos (BVDV-1 y BVDV-2). De acuerdo a los datos obtenidos con los procedimientos establecidos para cada una de las especies del BVDV, se detectó que 11 animales (11/19) portaban al BVDV-1 mientras que 8 (8/19) al BVDV-2. En la figura 6 se muestra un gel correspondiente al corrimiento del BVDV-1, mientras que en la figura 7 y 8 se hace referencia al corrimiento del BVDV-2.

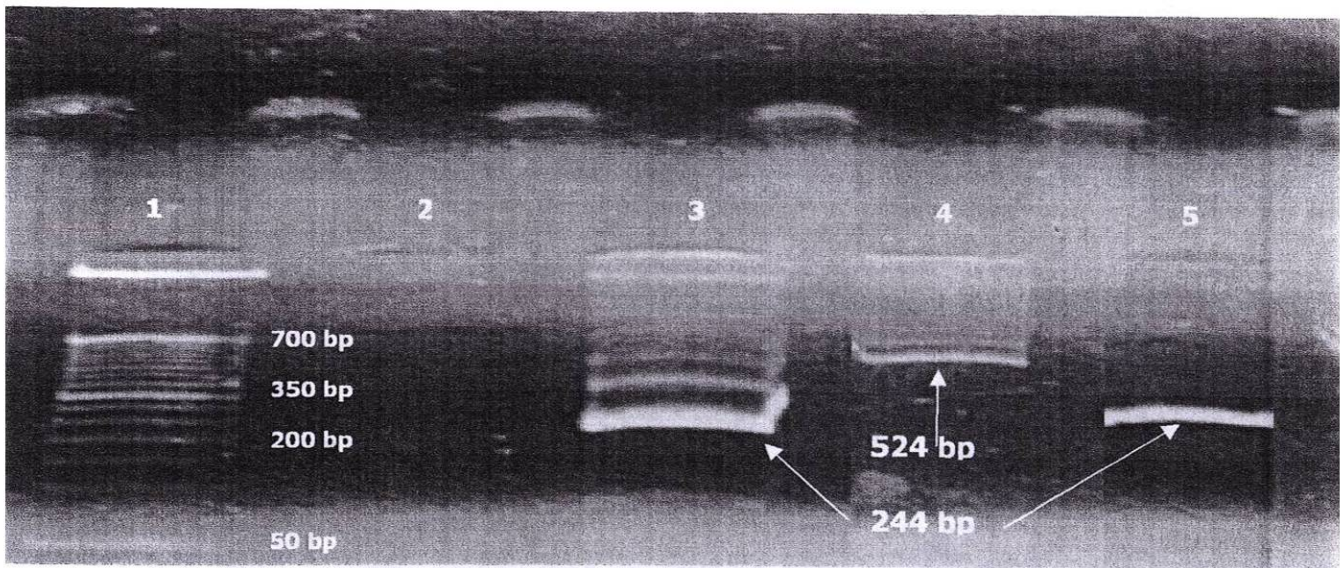


Figura 6. RT-PCR y snPCR para BVDV-1, en gel de acrilamida al 9%; carril 1 marcador de peso molecular de 50 bp, carril 2 control negativo, carril 3 control positivo a RT-PCR, carril 4 control positivo a snPCR, carril 5 control positivo a RT-PCR.

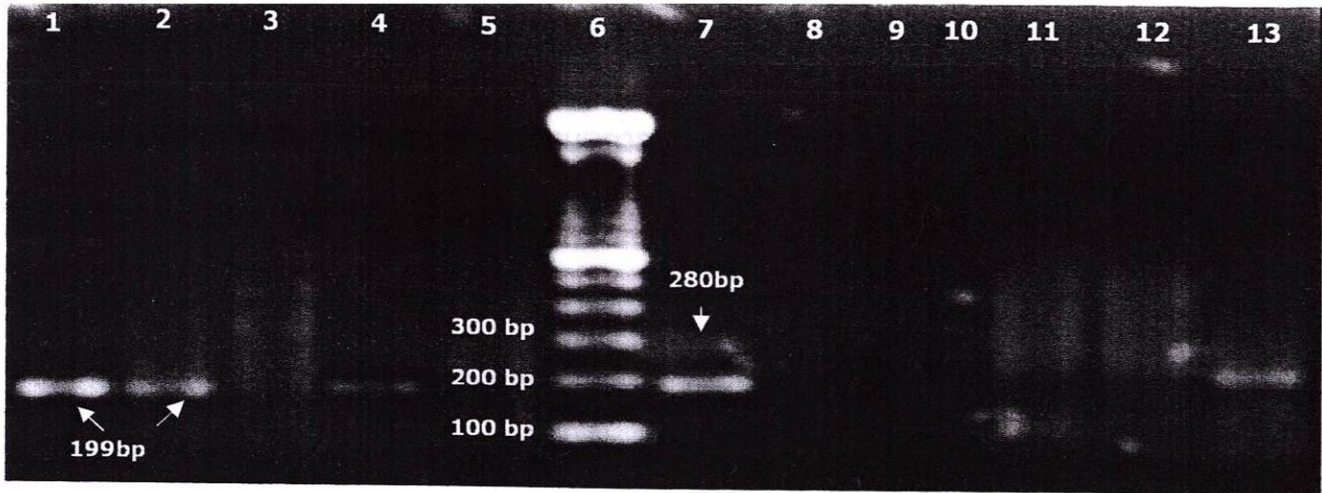


Figura 7. snPCR para BVDV-2, en gel de agarosa al 1.8%; carril 1,2,4,13 muestras de campo positivas, carril 5 sin muestra, carril 6 marcador de peso molecular de 100 bp, carril 7 control positivo, carril 8 control negativo, carril 9, 3, 10, 11 y 12 muestra negativa BVDV-2.

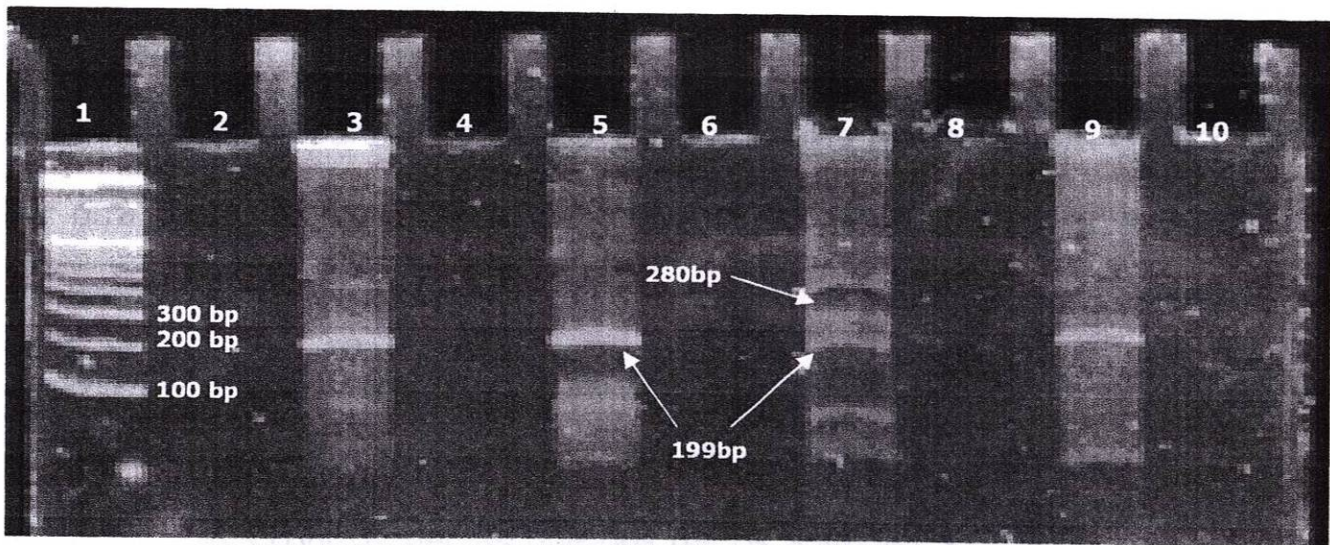


Figura 8: snPCR para BVDV-2, en gel de acrilamida al 9%, carril 1 marcador de peso molecular de 100 bp, carriles 2,6,8 y 10 sin muestra, carriles 3, 5 y 9 muestras positivas, carril 7 control positivo, carril 4 control negativo.

4.5 Globales

Se procesaron 73 muestras (sueros y sangre completa) de 5 hatos del Estado de Nuevo León, con un sistema de explotación vaca-becerro. El suero fue analizado mediante ELISA en formato indirecto (iELISA), para evidenciar la circulación del BVDV en los hatos analizados y la sangre completa se utilizó para establecer una técnica de diagnóstico molecular para Pestivirus y particularmente para las especies BVDV-1 y BVDV-2. De los sueros analizados resultaron 35 animales seropositivos al BVDV, mientras que la técnica establecida (diagnóstico molecular) arrojó 25 animales positivos. De estos últimos se analizó una muestra de 19 animales para la genotipificación (BVDV-1 y BVDV-2), resultando 11 animales positivos para el genotipo 1 y 8 animales positivos para el genotipo 2. Por otra parte, se logró identificar mediante la técnica molecular a 3 animales Persistentemente Infectados (PI) con el BVDV, en al menos un hato (hato número 5), esta identificación consistió en un muestreo doble (con un espacio de tiempo entre los muestreo de por lo menos 30 días) de los animales de este hato en particular. Se encontró además que dos de los animales PI fueron positivos para BVDV-1 mientras que un tercero resultó positivo al BVDV-2. En adición todos estos animales PI resultaron seronegativos a la prueba de ELISA, lo cual es una de las características reportadas para los animales con esta condición clínica (Sandvik, T., 2005, Goyal, S.M., 2005, Houe, H; 2003). Por otra parte, 9 de los 73 animales analizados resultaron positivos tanto para la presencia de anticuerpos anti-BVDV como secuencias de *Pestivirus*. Además, una importante proporción, 17 de los 73

analizados, resultó positivos al RT-PCR pero negativos a la prueba de ELISA. En estos 17 animales están incluidos los 3 PI mencionados anteriormente. Desafortunadamente no fue posible establecer en los 14 animales restantes si estos también portaban al BVDV de forma persistente. 26 animales resultaron positivos a ELISA y negativos al RT-PCR. Esta cifra nos indica que este grupo de animales no vacunados se han expuesto al BVDV por lo cual surge la posibilidad de que en estos hatos existan ya sea animales PI ó continua introducción de animales con infecciones agudas al hato. Al respecto, solo en el hato 5 se confirmo la presencia de animales PI, mientras que en los hatos 1, 2,3 no fue posible llevar a cabo tal propósito. En el hato 1 se encontró 2 animales seronegativos y RT-PCR positivos, mientras que en el hato 3 fueron 1 de 7 animales con estos resultados. Interesantemente, el hato 2 mostró un aparentemente alto nivel de infección al detectar 5 de 14 animales (35.7%) seronegativos pero positivos al RT-PCR. Del total de animales analizados 21 de ellos mostraron negatividad a ambas pruebas de detección. Los datos anteriormente descritos se muestran en forma concisa en los cuadros 9 y 10. En la figura 9 se exhiben muestras prototipo para la detección de *Pestivirus* y su diferenciación en los tipos 1 y 2 del BVDV, ya sea a partir de RT-PCR y/o snPCR.

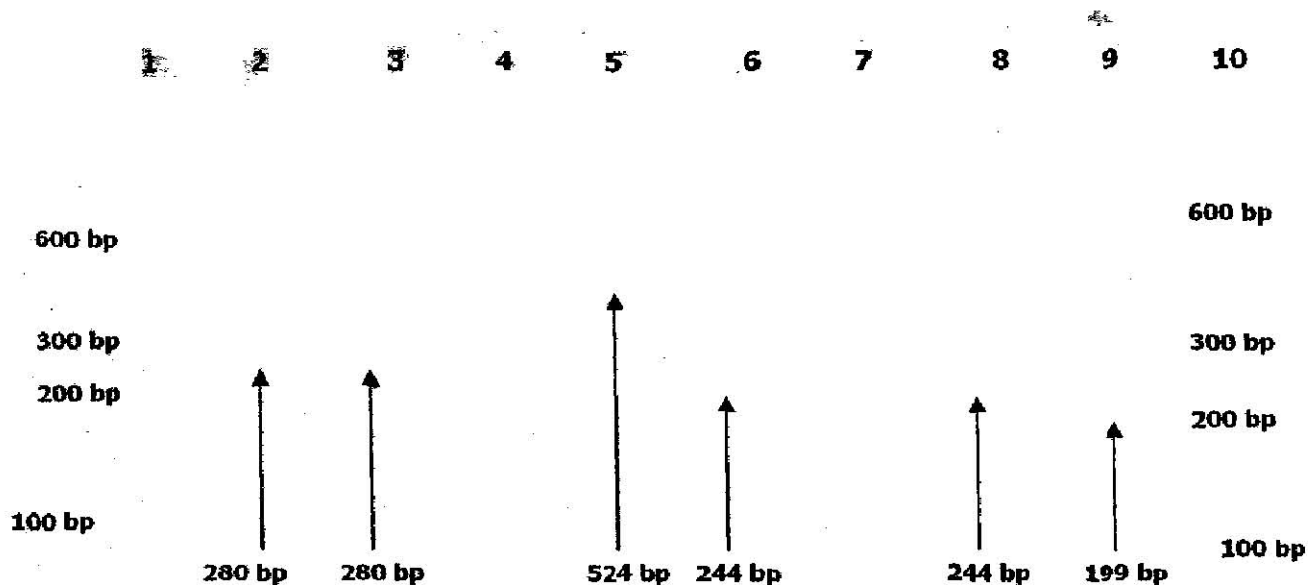


Figura 9. Gel general: gel de acrilamida al 9%; carril 1 marcador de peso molecular de 100bp, carril 2 pan-pestivirus positivo de muestra de campo, carril 3 control positivo pan-pestivirus, carril 4 control negativo del mismo, carril 5 RT-PCR para BVDV-1 correspondiente al control positivo, carril 6 snPCR para BVDV-1 correspondiente al control positivo, carril 7 RT-PCR para BVDV-1 de muestra de campo (nótese, la ausencia de amplificación), carril 8 snPCR para BVDV-1 de la muestra de campo localizada en el carril 7, carril 9 snPCR para BVDV-2 de muestra de campo, carril 10 marcador de peso molecular de 100 bp.

Cuadro 10. Relación entre las pruebas de ELISA^(*) y RT-PCR en la detección del Virus de la Diarrea Viral Bovina en muestras de campo del sistema vaca-cría.

		RT-PCR		
		+	-	
ELISA	+	9	26	35
	-	17	24	38
	Total	26	47	73

(*)Formato de ELISA indirecta (Bovine Virus Diarrhoea Virus [BVDV-Ab] SVANOVIR™, Svanova Biotech AB).

5 Discusión

El Virus de la Diarrea Viral Bovina, es un patógeno ampliamente difundido en las ganaderías de carne y leche al rededor del mundo, es causante de una amplia gama de manifestaciones clínicas y subclínicas. La habilidad del virus de mantenerse y propagarse entre hatos, se debe a las altas tasas de mutación que experimenta, lo que induce a una condición heterogénea de las especies virales, y por consiguiente el diagnóstico se torna complejo. (Ridpath, J.F.; 2003; Brock, K.V.; 2003). El diagnóstico molecular del BVDV, mediante la técnica de RT-PCR se ha empleado en diversas partes del mundo, usando secuencias artificiales (iniciadores) para amplificar regiones propuestas como conservadas dentro del género *Pestivirus*. La región 5' UTR es la más citada para dicho propósito, así tenemos que Becher, P; Orlich, M.; Thiel H.J.; 1998, proponen los iniciadores OL100 (colocados aproximadamente entre las nucleótidos 97-117) y OL380R (colocados aproximadamente entre los nucleótidos 380-360); ambos iniciadores usados ampliamente en este trabajo. Otros investigadores (Vilcek, S.; 1994), ha reportado el uso de los oligonucleótidos B_E (colocados entre los nucleótidos 108 a 127) y B₂ (colocados entre las nucleótidos 375 a 395) como los apropiados para el diagnóstico; algunos más (Hofmann, M.A; 1994; McGoldrick, A.; 1999) han propuesto que oligonucleótidos específicos para pan-pestivirus se alineen entre estos nucleótidos (171-382), (93-384), (228-383) y (100-383).

Si bien, la selección de iniciadores adecuados para el RT-PCR influye de manera positiva, existen otros factores relacionados con la elección del tipo de muestra, la facilidad de obtención y la viabilidad de los productos obtenidos a partir de ella, que también participan de manera activa en el resultado (Da Silva, N.; 1995, Goyal, S.M., 2005). En muestras de sangre, algunos autores han sugerido el uso de EDTA como uno de los mejores conservadores para este tipo de espécimen, ya que no interfiere con la extracción del ARN viral (Willems, M.; 1993); por otra parte se dice también que dentro de las células sanguíneas, las células blancas (leucocitos), juegan un papel importante en el establecimiento de la infección por el BVDV dentro del organismo y generalmente son usadas para la extracción del ARN total de la muestra (Bruschke, C.J.; 1998), como es el caso de los experimentos realizados en este trabajo.

En el presente estudio se decidió realizar un ELISA en formato indirecto con la única finalidad de evidenciar la circulación del BVDV en los hatos, si bien, se encontraron animales seropositivos en todas las explotaciones analizadas (5 Hatos), los factores implicados en la seropositividad, así como la prevalencia e incidencia del agente, entre otros, no fueron los objetivos primordiales de este estudio para análisis. La base estructural del estudio radicó en el establecimiento de una técnica de diagnóstico molecular para detectar la presencia del BVDV en sangre de bovinos, así como su diferenciación en las especies BVDV-1 y BVDV-2; por este motivo la atención se centra en la elección de los iniciadores, las muestras y la técnica. En el primero de los casos se decidió utilizar los iniciadores

propuestos por Becher, P; Orlich, M.; Thiel H.J.; 1998, debido a que estas secuencias están reportadas en diferentes trabajos de investigación a nivel mundial y principalmente por que el tamaño de banda obtenido mediante estos iniciadores es relativamente pequeño y con esto la amplificación de una carga viral reducida es factible. La decisión de usar sangre con anticoagulante y a su vez separar la placa leucocitaria, se debió en primera instancia a la facilidad de recolección, transporte y almacenamiento de la muestra y la subdivisión de esta (placa de leucocitos) obedeció a la citada relación que puede haber entre el virus y este tipo de células, y a la practicidad de la metodología empleada en la extracción del ARN total. En el desarrollo de la técnica para "Pan-Pestivirus", el material para discusión se centra principalmente en ligeros cambios realizados en las temperaturas de alineamiento de los iniciadores y las de extensión final, de aquellas reportadas por el experimento del cual se tomaron las bases (Avalos, R. R. 2002), así como en la compañía de los reactivos empleados en este procedimiento. Adentrados en el tema del diagnóstico molecular de las especies del virus, y específicamente en el BVDV-1, se hicieron cambios en la técnica diagnóstica (RT-PCR), originalmente reportada por Cedillo, S; 2004; empleando los iniciadores (OL380, BVDV 1aR y BVDV 1bR); y bajo un formato RT-PCR simple no fue posible evidenciar la amplificación de material alguno después de teñir con métodos convencionales, por tal motivo se optó por un PCR semi-anidado ("semi-nested") manejando como molde el producto de un RT-PCR utilizando los iniciadores OL100, BVDV 1aR y BVDV 1bR. En este PCR semi-anidado se

emplearon los iniciadores OL380, BVDV 1aR y BVDV 1bR, reportados por Cedillo, S; 2004. Con el genotipo 2 también se aplicó un PCR semi-anidado utilizando como templado el producto de amplificación del RT-PCR para "Pan- Pestivirus". En el PCR, se usaron los iniciadores específicos para BVDV-2 (BVDV_{Sa}, BVDV_{Sb} y BVDV_{Sc}), reportados por Arias, P.; 2003 y el OL380R, reportado por Becher, P; 1998, las condiciones para las temperaturas de amplificación fueron propuestas por Avalos, R. R. 2002 y Cedillo, S; 2004, para ambos genotipos. Debido a la alta sensibilidad RT-PCR es considerado como un procedimiento alternativo a los métodos comunes de detección del BVDV. La detección del virus mediante RT-PCR es más rápida y sensible que el aislamiento viral y además esta no es afectada por la presencia de anticuerpos en la muestra (Goyal, S.M., 2005). Sin embargo, esta prueba no diferencia entre ácidos nucleicos obtenidos a partir de un virus activo ó inactivo, por lo que es probable que se obtengan resultados falsos positivos con respecto a la circulación de BVDV activo en los animales (Givens, M.D.; 2002). No obstante todo lo anterior, se recomienda ampliar las observaciones aquí señaladas para lograr la validación del procedimiento de RT-PCR empleado y su posible uso bajo situaciones de campo o de laboratorio.

6 Conclusiones

Este trabajo tuvo a fin establecer una prueba diagnóstica para detectar la presencia del BVDV en bovinos e igualmente evidenciar los genotipos circulantes del virus en la región. El número de muestras empleadas se consideran suficientes para el objetivo del estudio, ya que si bien no son representativas para establecer la prevalencia del virus y sus especies mediante métodos moleculares en el estado, tienen la capacidad de ser un antecedente sustancioso, por ser de una técnica de diagnóstico nueva al menos en la entidad.

Aparentemente, ocurre una alta frecuencia de circulación del BVDV en hatos del sistema vaca-cría, lo cual es muy probable dado que los animales analizados no se habían expuesto al virus vacunal y mostraban altos índices de seropositividad. De acuerdo a la metodología empleada en la zona circulan tanto el BVDV-1 como el BVDV-2, lo cual es de destacar dado que no existen reportes de la circulación del BVDV-2 en México; no obstante sería recomendable establecer estudios para validar estas observaciones.

Igualmente, y basados en lo anterior, se logró detectar la presencia de animales persistentemente infectados con el BVDV (ambas especies) en los hatos estudiados.

7. Literatura Consultada

- **Arias, P., Orlich, M., Prieto, M., Cedillo, R.S., Thiel, H.J., Álvarez, M., Becher, P.** 2003. Genetic Heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. *Veterinary Microbiology*. **96**: 327-336.
- **Avalos, R.R.** 2002. Phylogenetische Analysen und antigenetische Verwandtschaft von Pestiviren. Doktorat Thesis. Justus Liebig Universität. Giessen, Deutschland. ISBN: 3-89687-594-9.
- **Becher, P.; Orlich, M., Thiel, H.J.** 1998. Complete Genomic Sequence of Border Disease Virus, a Pestivirus from Sheep. *Journal of Virology*, **78** (6): 5165-5173.
- **Brackenbury, L.S., Carr, B.V., Charleston, B.** 2003. Aspects of the innate and adaptative immune responses to acute infections with BVDV. *Veterinary Microbiology*. **96**: 337-344.
- **Brock, K.V.** 2003. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*. **31**: 113-135.
- **Brownlie, J., Hooper, L.B., Thompson, I., Collins, M.E.** 1998. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV)-the bovine pestivirus. *Clinical and Diagnostic Virology*. **10**: 141-150.
- **Bruschke, C.J., Weerdmeester, K., Oirschot J.T., Rijn, P.A.** 1998. Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Veterinary Microbiology*. **64**: 23-32.

- **Bukulmez, O., Arici, A.** 2000. Leucocytes in ovarian function. *Human Reproduction*. **6**:1-15

- **Cantú, C.A.** 2002. Factores asociados en la Epidemiología de los principales problemas reproductivos en bovinos productores de carne en el estado de Nuevo León. (IBR, BVD, leptospirosis). <http://www.unionganaderanl.org.mx> . Consultado el 23 de Enero de 2006

- Cedillo, R.S.** 2004. Charakterisierung rumianter Pestiviren mittels Polymerasekettenreaktion und monoklonaler Antikörper. DVG Service GMBH, Giessen, Alemania, pp. 36-39.

- **CFPPNL.** 2004. Noticias de Salud Animal en la Ganadería. *Comunicación Ganadera*. Vol. 6. Nº3. Marzo 2004. pp 13.

- **Collett, M.S. Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D.K., Purchio, A.F.** 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology*. **165**:191-199.

- **Correa, G.P.; Brown, L.N.** 1973. Presencia anticuerpos contra rinotraqueitis infecciosa, diarrea viral bovina, parainfluenza 3, brucelosis, leptospirosis, vibriosis y *Haemophilus somnus* en sueros de bovino con problemas patológicos, reproductores y respiratorios. *Técnica Pecuaria en México*. **29**:26-33.

- **Da Silva, N.; Zardoya, R; Santurde, G.; Solana, A., Castro, J.M.** 1995. Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhea virus genome in semen. *Journal of Virological Methods*. **55**: 209-218.

- **Evermann, J.F., Ridpath J.F.** 2002. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Veterinary Microbiology*. **89**:129-139.
- **Fray, M.D., Paton, D.J., Alenius, S.** 2000. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Animal Reproduction Science*. **60-61**: 615-627.
- **Fulton R.W., Ridpath, J.F., Confer, A.W., Saliki, J.T., Burge, L.J., Payton, M.E.** 2003. Bovine Viral Diarrhoea Virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals*. **31**: 89-95.
- **Fulton, R.W., Briggs, R.E., Ridpath, J.F., Saliki, J.T., Confer, A.W., Payton, M.E., Duff, G.C., Step, D.L., Walker, D.A.** 2005. Transmission of Bovine Viral Diarrhoea Virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. **69**: 161-169.
- **Givens, M.D.; Riddell, K.P.; Galik, P.K.** 2002. Diagnostic dilemma encountered when detecting bovine viral diarrhoea virus in LVF embryos production. *Theriogenology*. **58**: 1399-1407.
- **Goens, S.D.** 2002. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Canadian Veterinary Journal*. **43**: 946-954.
- **Goyal, S.M., Ridpath, J.F.** 2005. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management, and control .Blackwell Publishing: Ames, Iowa.

- **Grooms, D., Backer, J.C., Ames, T.R.** 2002. Diseases caused by Bovine Viral Diarrhea Virus. Smith, B.P. (Ed.), Large Animal Internal Medicine, 3ra. Ed., Mosby, USA, pp, 707-714.
- **Hofmann, M.A., Brechtbuehl, K., Staeuber, N.** 1994. Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. *Arch. Virol.* **139**: 217-229.
- **Houe, H.** 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals.* **31**: 137-143.
- **Lindberg, A.L., Alenius, S.** 1999. Principles for eradication of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology.* **64**:197-222.
- **Lindenbach, B.D., Rice, C.M.** 2001. Flaviviridae: The Virus and their Replication, Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology, 4ta ed., Vol 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp, 991-1022.
- **Mena, G.L.** 2002. Acciones para incrementar el porcentaje de cosecha de becerros. <http://www.unionganaderani.org.mx> .Consultado el 23 de Enero de 2006.
- **McGoldrick, A., Bensaude, E., Ibata, G., Sharp, G., Paton, D.J.** 1999. Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with Fluorescent probes, *J. Virol. Methods.* **79**: 85-95.

- **Perdrizet, J.A., Rebhun, W.C., Dubovi, E.J., Donis, R.O.** 1986. Bovine Virus Diarrhea- Clinical Syndromes in dairy herds. *Cornell Vet.* **77**:46-74.
- **Ridpath, J.F.** 2003. BVDV genotype and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals.* **31**:127-131.
- **Sandvik, T.** 2005. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVDV control programmes. *Preventive Veterinary Medicine.* **72**(1-2):3-16.
- **Siegwart, N., Hilbe, M., Hässig, M., Braun, U.** 2005. Increased risk of BVDV infection of calves from pregnant dams on communal Alpine pastures in Switzerland. *The Veterinary Journal.* In press.
- **Solis, C.J.J., Segura, C. V.M., Segura, C.J.C.** 2005. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine.* **72**(3-4):253-262.
- **Suárez, D. H.; Tirado, L.Q.** 2004. La ganadería bovina productora de carne en México, situación actual. <http://agrinet.tamu.edu/trade/papers/hermilo.pdf>
Consultada del 22 de Agosto de 2005
- **Tautz N., Meyers, G., Thiel, H.J.** 1998. Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. *Clinical and Diagnostic Virology.* **10**: 121-127.
- **Tautz, N., Harada, T., Kaiser, A., Rinck, G., Behrens, S.E., Thiel, H.J.** 1999. Establishment and Characterization of Cytopathogenic and Noncytopathogenic Pestivirus Replicons. *Journal of Virology.* **73**: 9422-9432.

- **Thiel, H.J., Collet, M.S., Gould, E.A., Heinz, F.X., Houghton, M., Meyer, G., Purcell, R.H.** 2000. Flaviviridae. The VIIth report of international committee for the taxonomy of viruses (ICTV). Academic Press. Pp. 859-878.

- **Vilcek, S., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P., Paton, D.J.** 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* **136**: 309-323.

- **Villarreal, T.V.** 1981. Presencia de Anticuerpos Seroneutralizantes contra Diarrea Viral Bovina en Diferentes Regiones de México. Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. pp 49.

- **Willems, M., Moshage, H., Nevens, F., Fevery, J., Yap, S.H.** 1993. Plasma colet form heparinized blood is not suitable for HCV-RNA detection by conventional RT-PCR assay. *J. Virol. Methods.* **42**:127-130.

Apéndice

Recomendaciones para trabajar en una campana de PCR:

1. Antes de empezar a trabajar se debe limpiar la campana de PCR, pipetas, gradillas para tubos para PCR de plástico y la superficie externa de frascos contenedores de los tubos empleados en la técnica y contenedores de puntillas con solución de remoción de RNAsas (RNase AWAY®).
2. Hecho lo anterior, se utiliza luz ultravioleta (UV) por un espacio de tiempo de 15 minutos.
3. Todos los cálculos aritméticos para la mezcla de reacción deben estar ya hechos, el material con el que se va a trabajar (RNA, iniciadores y reactivos para el RT-PCR), deben de estar ya en la hielera de trabajo.
4. Se deben emplear las medidas de seguridad básicas para trabajar con la técnica de PCR (bata blanca de manga larga, guantes estériles, gafas y cubrebocas).
5. En el lugar de trabajo solo estará la persona que este realizando la técnica.

Recomendaciones para trabajar en una campana de extracción de ARN:

1. Las recomendaciones de este punto son las mismas que en el punto número de 1 de las recomendaciones para la técnica de PCR.
2. Se utiliza la luz ultravioleta (UV) por espacio de 15 a 20 minutos.
3. Se deben emplear las medidas de seguridad básicas para trabajar con la extracción de ARN (bata blanca de manga larga, guantes estériles, gafas y cubrebocas).
4. Se deben manipular las muestras con mucha precaución, ya que se corre el riesgo de infectarse con algún material biológico que pueda contener la muestra.
5. Los reactivos empleados en la extracción deben manejarse bajo las medidas de seguridad que se indiquen en su etiqueta.
6. El ARN es un material muy sensible por lo que solo debe estar una persona realizando la técnica bajo las condiciones expuestas en los demás puntos.

Reactivos para la extracción del ARN, que no están contenidos en el estuche comercial:

-Cloroformo al 100%; para contener este reactivo se debe utilizar un frasco oscuro, debido a que la luz lo desestabiliza; este frasco debe estar limpio y lavado con agua tratada con DEPC. Se debe poner una etiqueta que diga la concentración, la fecha de emvasado y en que técnica se va a emplear.

-Isopropanol al 100%; para el emvasado y manejo de este reactivo se toman las mismas consideraciones que en el reactivo descrito anteriormente.

-Etanol al 70%, para la preparación de 100ml de esta solución se utilizan 70ml de etanol al 100% y 30ml de agua ultra pura estéril. El contenedor de esta solución debe estar lavado con agua tratada con DEPC.

-Agua tratada con DEPC (Dietil Pirocarbonato) 0.1% (v/v), la elaboración de este reactivos se hace en una campana con extractor de vapores, debido a que el DEPC es muy tóxico; por cada 500ml de agua bidestilada se le agrega 0.5ml de DEPC, agitando muy bien el frasco contenedor para asegurar una homogenización, posteriormente se incubaba a 37°C POR 8 horas o bien toda la noche para después llevar a la autoclave (121° por 15 a 20 minutos).

Preparación de reactivos para electroforesis en gel de agarosa al 1.8%

- Gel de agarosa al 1.8%

Agregar 1.8 gramos, a 100ml de TE1x y calentar en microondas hasta que la agarosa esté líquida y transparente.

- Amortiguador TE 50x pH 8.0:

Disolver 242g de Tris base, 57.1g de ácido acético y 18.61g de EDTA en de agua desionizada y aforar a 1 litro. Usar el potenciómetro para calibrar el pH a 8, posteriormente se debe esterilizar y mantener a temperatura ambiente.

- Amortiguador TBE 1x:

Mezclar 20ml de TE 50x con 980ml de agua desionizada para preparar 1litro de solución y agitar vigorosamente para asegurar homogenización.

Preparación de reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida

- Ingredientes del gel de poliacrilamida (10ml)

Bisacrilamida.....	3.2ml
Tris base.....	1.6ml
Agua bidestilada estéril.....	4.7ml
APS.....	196µl
Temed.....	15µl

- Solución bis-acrilamida 30%

Disolver 29.2g de acrilamida y 0.8g de bis-acrilamida, aforar a 100ml y filtrar en papel Whatmann #1. Almacenar a temperatura ambiente en frascos ámbar u oscuros.

-Persulfato de amonio 10%

Disolver 1g de Persulfato de Amonio en 10ml de agua bidestilada. Colocar alícuotas de 1ml en tubos para microcentrífuga de 1.5ml y almacenar en congelación hasta su uso.

- Amortiguador Tris-base [2M] pH 8.8

Tris-base..... 12.1g

Agua bidestilada..... 35ml

HCl concentrado..... 4ml *

* Aproximadamente , hasta alcanzar el pH de 8.8, luego aforar a 50ml.

- Amortiguador de corrimiento 10X

Glicina..... 34.6g

Tris-base..... 7.2g

Aforar a 300ml con agua bidestilada. Para preparar la solución al 1X se mezclan 25ml (10X)+ 250ml de agua bidestilada.

Preparación de amortiguador de carga par electroforesis

- Amortiguador de carga para verificación de extracción de ARN

95% (v/v) de formamida desionizada
0.025% (w/v) de azul de bromofenol
0.025% (w/v) de xilencianol
5mM de EDTA (pH 8)
0.025% (w/v) de lauril sulfato

Todos estos reactivos se aforan a 5ml con agua desinizada.

- Amortiguador de carga para electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 ml de glicerol aforando a 10 ml.

Programa de corrimiento para geles de agarosa y poliacrilamida

- Geles de agarosa al 1.8%

Se utilizó un tiempo de corrimiento de 30 minutos a 400watts (W), 400 mili amperes (mA) y 100 voltios (V)

- Geles de poliacrilamida al 9%

Se utilizó un programa de corrimiento de 50 minutos a 400W, 400mA y 100V.

Tinción de los geles de agarosa y poliacrilamida

- Bromuro de etidio a 0.1%:

Se adicionan 20µl de bromuro de etidio (10mg/ml) en 200ml de agua bidestilada.

