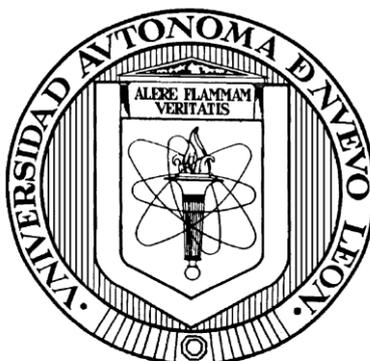


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA - VETERINARIA



**“ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DIAGNÓSTICO PARA
LA IDENTIFICACIÓN DE BOVINOS PERSISTENTEMENTE
INFECTADOS O CON INFECCIONES AGUDAS CON EL *VIRUS*
DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (BVDV) DESTINADOS A
ENGORDA”**

TESIS

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL
POR**

CATALINA DE LA CRUZ SAAVEDRA

ESCOBEDO, N.L.

JUNIO DE 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA - VETERINARIA



“ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DIAGNÓSTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BOVINOS persistentemente infectados o con infecciones agudas con el *VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (BVDV)* DESTINADOS A ENGORDA”

REVISADA POR:

Dra. Sibilina Cedillo Rosales

Asesor

Dr. Ramiro Ávalos Ramírez

Co-Asesor

Dr. José Antonio Salinas Meléndez

Co-Asesor

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila

Co-Asesor

Dr. Alberto Morales Loredo

Co-Asesor Externo

Esta tesis fue realizada con el apoyo financiero del Programa PAICYT de la UANL, el Programa PIFI otorgado a la FMVZ de la UANL por parte de la Secretaría de Educación Pública. Además del apoyo otorgado por la Unión Ganadera Regional de Nuevo León para la importación de los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales contra proteínas específicas de *Pestivirus*.

Un agradecimiento muy especial al Laboratorio Central Regional de Monterrey dirigido por el Ing. José G. Muraira Gutiérrez por permitir que hiciéramos uso de sus instalaciones y equipos para la realización de una gran parte del trabajo de laboratorio de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre María Elena Saavedra Vicuña, por la vida, los regaños, las enseñanzas, por su apoyo incondicional, sus dichos, sus enojos, sus consejos, su comportamiento y por su forma de acompañarme a la distancia. Al igual que mi Padre Jorge Raúl De La Cruz, que en paz descanse, porque llevaré siempre sus recuerdos y sus enseñanzas de vida junto a mí.

A mi esposo Guga por todo el apoyo incondicional que me dio, consejos y ayuda para concentrarme en trabajar en la tesis y a mi hija Renata por sus risas, besos y cariños que me ayudaron a tener la fuerza suficiente para avanzar.

A mis abuelos el “Tata” y la “María Angélica” por todo el cariño, apoyo, consejos y cuidados brindado durante mi vida.

A mi asesora la Dra. Sibilina Cedillo Rosales, por todo su apoyo, por haberme propuesto para ayudarme a desarrollar este proyecto, sus clases u enseñanzas, gracias por todo.

A mi asesor el Dr. Ramiro Ávalos Ramírez, por su ayuda, sus clases y sus consejos, gracias.

Gracias al Dr. Alberto Morales por todo el apoyo brindado para realizar este trabajo y desarrollarlo en el “Laboratorio Central Regional de Monterrey.” (LCRM). Así como a todo el Laboratorio de Biología Molecular de esta misma institución por darme la posibilidad de aprender y trabajar las muestras cuando lo necesité. Gracias Alejandro Martínez y a todo el equipo de este laboratorio.

A mi amigo y Maestro Gabriel de León gracias por enseñarme las técnicas de cultivo, aislamiento, seroneutralización, titulación, inmunofluorescencia indirecta, entre otras, y por toda la paciencia, tolerancia, apoyo, consejos, amistad y buena compañía durante el desarrollo de la tesis.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, por sus enseñanzas, al Departamento de Genética (Stephany y Cynthia) por su ayuda y compañía y al Departamento de Virología, gracias Leslee por todo tu apoyo y por todo el tiempo que me ayudaste y acompañaste a correr los RT-PCR y a esperar los geles.

A todos los ganaderos involucrados, que nos dieron la oportunidad de trabajar con el material de muestras para poder desarrollar este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	3
1.1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.2 METAS	4
1.3 HIPÓTESIS	4
2 ANTECEDENTES / LITERATURA REVISADA.....	5
2.1 Taxonomía y espectro de especies de <i>Pestivirus</i>	5
2.2 Biología molecular de los <i>Pestivirus</i>	6
2.3 Presentaciones clínicas de las infecciones por <i>BVDV</i>	7
2.3.1 Presentación subclínica de las infecciones por <i>BVDV</i>	8
2.3.2 Presentación de las infecciones agudas por <i>BVDV</i>	8
2.3.3 Infección congénita	10
2.3.4 Complejo Respiratorio Bovino.....	11
2.3.5 Diarrea Viral Bovina en becerros recién nacidos	12
2.3.6 Síndrome Hemorrágico	12
2.3.7 Producción de animales persistentemente infectados	13
2.3.8 Presentación clínica de la Enfermedad de las Mucosas	16
2.4 Diagnóstico de las infecciones por <i>BVDV</i>	18
2.4.1 Diagnóstico a través de las manifestaciones Clínicas de las infecciones por <i>BVDV</i>	19
2.4.2 Diagnóstico a través de la detección de anticuerpos anti- <i>BVDV</i>	20

2.4.3	Detección de virus o partículas virales	21
2.4.4	Inmunodetección en cultivo celular	24
2.4.5	Detección del ácido nucleico viral:	26
2.5	Programa de control y erradicación para <i>BVDV/MD</i>	27
3	MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1	Material.....	31
3.1.1	Equipo y material consumible	31
3.1.2	Material biológico	32
3.1.3	Cultivo Celular y aislamiento viral	32
3.1.4	Reactivos y estuches comerciales y enzimas.....	32
3.2	METODOLOGÍA	34
3.2.1	Lugar de trabajo.....	34
3.2.2	Aislamiento Viral	34
3.2.3	Inmunodetección y confirmación de cepas no citopáticas de <i>BVDV</i> a través de Inmunoperoxidasa.....	35
3.2.4	Reacción en cadena de la Polimerasa acoplada con Transcriptasa Reversa (RT-PCR) para la detección de <i>BVDV 1 - 2</i>	36
3.2.5	Comparación de la prueba diagnóstica de Aislamiento Viral, Inmunoperoxidasa indirecta y RT-PCR para <i>BVDV</i>	38
3.2.6	Muestreo en un Lote de Bovinos destinados a corral de engorda para la detección de <i>BVDV</i> mediante aislamiento e Inmunoperoxidasa Indirecta.....	40
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Establecimiento del aislamiento viral para <i>BVDV</i>	42
4.2	Estandarización de la Inmunoperoxidasa Indirecta para la detección de <i>BVDV</i> ..	43

4.3	Resultados RT-PCR para <i>BVDV</i>	44
4.4	Resultados de la prueba comparativa del Aislamiento Viral, Inmunoperoxidasa indirecta y RT-PCR para <i>BVDV</i>	45
4.5	Resultados del muestreo en un lote de bovinos destinados a corral de engorda.	48
5	DISCUSIÓN	51
6	CONCLUSIÓN.....	63
7	BIBLIOGRAFÍA	64
	ANEXOS	76

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1: Esquema de la placa de cultivo utilizada para determinar la titulación viral de la cepa control <i>BVDV-I</i> , NADL (TCID ₅₀ /ml).....	39
Fig. 2: Efecto citopático de la cepa control de <i>BVDV-I</i> , NADL así como control negativo de infectividad en una monocapa celular.....	42
Fig. 3: Tinción de Inmunoperoxidasa indirecta para <i>BVDV-I</i> , NADL y control negativo.....	44
Fig.4: Electroforesis del producto de RT-PCR para <i>Pestivirus</i>	45
Fig.5: Electroforesis de los amplicones por RT-PCR para <i>BVDV-NADL</i> usado como prueba confirmatoria en la titulación del virus.....	46
Fig. 6: Resultados de la comparación de las técnicas en base a el cálculo de TCID ₅₀ /ml del virus citopático NADL.....	47
Fig. 7: Tinción de Inmunoperoxidasa para la titulación viral de la cepa NADL...	48
Tabla 1: Total de sueros analizados por la prueba de ELISA (detección de anticuerpos contra <i>BVDV</i>) y total de “pools” para someter a aislamiento viral.....	41

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
Ag	Antígeno
ARN	Ácido Ribonucleico
+ssARN	ácido ribonucleico cadena sencilla de polaridad positiva
BLV	Virus de la Leucosis Bovina “ <i>Bovine Leukaemia Virus</i> ”
BoHV-1	Herpesvirus Bovino Tipo 1 “ <i>Bovine Herpesvirus 1</i> ”
BVDV	Virus de la Diarrea Viral Bovina “ <i>Bovine Virus Diarrhea Virus</i> ”
BVDV-1	Virus de la Diarrea Viral Bovina tipo 1 “ <i>Bovine Virus Diarrhea Virus 1</i> ”
BVDV-2	Virus de la Diarrea Viral Bovina tipo 2 “ <i>Bovine Virus Diarrhea Virus 2</i> ”
BDV	Virus de la Enfermedad de las Fronteras “ <i>Border Disease Virus</i> ”
BSA	Albumina Sérica Bovina “Bovine Serum Albumin”
C	Proteína de la Cápside
CO ₂	Dióxido de Carbono
CODE 7	Anticuerpo monoclonal para la detección de <i>Pestivirus</i>
°C	Grados Celsius
cp	Citopático
CPE	Efecto citopático “Cytopathic Effect”
CP	Control Positivo
CN	Control Negativo
CSFV	Virus de la Fiebre Porcina Clásica “ <i>Classical Swine Fever Virus</i> ”

DEPC	Dietyl Pirocarbonato.
DMEM/12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/12
EBTr	Células Traqueales Embrionarias Bovinas “ <i>embryonic bovine tracheal (EBTr) cells</i> ”
EDTA	Etilen Diamino Tretra Acético
ELISA	Inmunoensayo Ligado a Enzima
ELISAi	Inmunoensayo Ligado a Enzima indirecta
CRB	Complejo Respiratorio Bovino
HD	Huésped Definitivo
HI	Huésped Intermediario
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
h	horas
HRP	Peroxidasa de Rábano Picante
SH	Síndrome Hemorrágico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
IBR	Rinotraqueítis Infecciosa Bovina
IF	Inmunofluorescencia
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IHQ	Inmunohistoquímica
IPOI	Inmunoperoxidasa Indirecta
Kb	Kilobases
L	Litros
MD	Enfermedad de las Mucosas “Mucosal Disease”
MDBK	Línea celular de riñón bovino “Madin Darby Bovine Kidney”
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio.

ml	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
Ncp	No citopático “Non cytopathic”
N.L.	Nuevo León
Npro	N-terminal proteasa
NTR	Regiones no codificadas “ <i>non-translated region</i> ”
OD	Densidad Óptica
ORF	Marco abierto de lectura “ <i>Open Reading Frame</i> ”
O ₂	Oxígeno molecular
pb	Pares de Bases
PBS	Tampón o buffer fosfato salino
pmol	Picomol
PI	Persistentemente Infectado.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
Prot. G	Proteína G
RT	Transcriptasa reversa
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa acoplada
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico “ <i>sodium dodecyl sulfate</i> ”
SE	Suero Equino
seg	Segundos
SNC	Sistema Nervioso Central
spp.	Especies
TA	Temperatura ambiente

TCID ₅₀ /ml	Dosis infectiva al 50% para el cultivo celular por mililitro.
μl	Micro litro
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen sobre volumen.
W	Nucleótidos A ó T en determinada posición de la secuencia genética.
w/v	Peso sobre volumen.
Y	Nucleótidos C ó T en determinada posición de una secuencia genética.

RESUMEN

El Virus de la Diarrea Viral Bovina es el causante de una variedad de trastornos digestivos, reproductivos y respiratorios que causa a nivel mundial grandes pérdidas económicas, tanto por la baja fertilidad y abortos que ocasiona en los sistemas vaca-cría, como por la baja ganancia de peso de los animales en corrales de engorda. Las infecciones por este virus causan distintos síndromes que van desde la presentación subclínica hasta la muerte de los animales por la presentación de Síndromes como el Hemorrágico o la Enfermedad de las Mucosas. Para el control de esta infección uno de las bases más importantes es la detección oportuna de infecciones persistentes (PI) que pueden desarrollarse en animales durante los primeros 120 días de gestación, así como la eliminación de los mismos en el lote o hato, por lo que un método diagnóstico adecuado permitiría detectar estos animales PI. Así mismo, son muy importantes las medidas de bioseguridad que se aplican en hatos bovinos para evitar la introducción de animales PI que mantengan las infecciones en el hato. Es un requisito para importación en muchos países pruebas que garanticen que los animales sean libres del virus. El objetivo de éste estudio fue establecer un sistema diagnóstico que nos permita detectar bovinos con infecciones persistentes o agudas en un lote destinado a corral de engorda o la exportación. Los bovinos de este lote presentaban buen estado de carnes y aparentemente sanos, tenían distintos orígenes de procedencia en la República Mexicana por lo que se estableció un sistema de aislamiento viral para el *BVDV* seguido de la prueba confirmatoria de inmunodetección indirecta con peroxidasa, confirmando estos datos con pruebas de RT-PCR para detectar la presencia de biotipos citopáticos y no citopáticos de *BVDV* a partir de muestras de suero. Se encontró como resultado un alto título de anticuerpos específicos contra *BVDV* (68%) sin poder determinarse que la seroprevalencia fue debido al efecto de la vacunación ó a infecciones agudas. Por tal

motivo y sabiendo de la posible existencia de animales PI en un lote con altas seroconversiones fue muy importante procesar las 5390 muestras procedentes del lote. Para este lote bovino no se detectó la presencia de animales persistentemente infectados o con infecciones agudas mediante la metodología establecida.

1 INTRODUCCIÓN

Los problemas más importantes que merman la producción bovina en el mundo los constituyen los problemas respiratorios, digestivos y reproductivos, que son asociados a múltiples agentes etiológicos entre ellos de tipo viral, bacteriano inclusive parasitario. De estos, las infecciones virales son generalmente importantes en el establecimiento de síndromes y propician la presentación de enfermedades secundarias. En bovinos el *Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV)* es uno de los agentes etiológicos importantes económicamente a nivel mundial ya que causan pérdidas económicas cuantiosas en todos los sistemas de producción. En el sistema de producción vaca-becerro el síndrome reproductivo es importante ya que además de afectar la producción de becerro permite la producción de animales persistentemente infectados (animales PI), que diseminan y mantienen la circulación del virus en el hato y lo pueden propagar en otros hatos al ser introducidos como sementales o vacas de remplazo. En estas situaciones la identificación y eliminación de animales PI es el punto clave para disminuir la prevalencia e incidencia de *BVDV* en los hatos. Por otro lado la presencia de animales PI en corrales de engorda o proteros para pastoreo se ve relacionada con el desarrollo del síndrome respiratorio bovino y o síndromes digestivos que ocasionan pérdida de peso o evitan la ganancia de éste, por lo que es importante que en estos sistemas de producción se evite la presencia de animales con infecciones persistentes o agudas con *BVDV*.

Para disminuir las infecciones por *BVDV* se han implementados programas de control y erradicación de *BVDV* en otros países del mundo, donde en algunos, el programa es oficial y en otros es un programa voluntario. Dentro de las estrategias que se llevan a cabo para hacer el control y erradicación de las infecciones por *BVDV* son: contar con un sistema diagnóstico adecuada que pueda identificar animales con

infecciones agudas y persistentes, así como sus reservorios (rumiantes silvestres, domésticos y cerdos); la detección y eliminación de animales persistentemente infectados; el empleo de un sistema de vacunación enfocado a disminuir la producción de animales PI y la presentación de sintomatología digestiva y respiratoria; así como un sistema constante de monitoreo y bioseguridad de los hatos entre otros.

En este sentido es importante que el sistema diagnóstico utilizado sea lo suficientemente sensible y específico para la detección de partículas virales, antígenos o material genético, por lo que en este trabajo se implementó un sistema diagnóstico que nos permitió escanear muestras séricas de bovinos destinados a corrales de engorda para detectar la presencia del *BVDV*.

El sistema diagnóstico propuesto incluye un sistema de cultivo celular que permite el aislamiento del virus, así como dos pruebas comprobatorias, la inmunodetección con anticuerpos monoclonales específicos para *BVDV* e inmunoperoxidasa y la detección de una región del genoma viral a través de La Transcriptasa Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), pruebas sugeridas por la OIE como diagnóstico básico para este virus, dicha metodología se pretende establecer para el escaneo de lotes de bovinos destinados a corral de engorda o a la exportación y detectar la presencia de animales PI o con infecciones agudas.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer un sistema de diagnóstico que nos permita monitorear lotes de bovinos en un centro de acopio para detectar animales PI o con infecciones agudas que se destinan a corrales de engorda a través del aislamiento viral y pruebas confirmatorias como la inmunoperoxidasa y RT-PCR.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un sistema de aislamiento viral para el virus de *BVDV* en cultivo celular a partir de muestras de suero de bovinos.
- Estandarizar la prueba de inmunodetección específica para el virus de la *BVDV* mediante el uso de anticuerpos específicos contra las proteínas NS3 y E2 en cepas de tipo citopático y no citopático, utilizando para su detección proteína G marcada con peroxidasa.
- Aplicar la técnica de RT-PCR como prueba confirmatoria del aislamiento de *BVDV*, en cepas citopáticas y no citopáticas.
- Aplicar la metodología establecida para detectar el *BVDV* en un lote de bovinos destinados a la producción de carne y la exportación.

1.2 METAS

Establecer un sistema de monitoreo que permita detectar animales PI o con infecciones agudas del *BVDV* en lotes de bovinos destinados a producción de carne.

1.3 HIPÓTESIS

Con la metodología establecida (aislamiento viral, inmunodetección con inmunoperoxidasa y RT-PCR) es posible detectar bovinos con infecciones persistentes o agudas del *BVDV*.

2 ANTECEDENTES / LITERATURA REVISADA

2.1 Taxonomía y espectro de especies de *Pestivirus*.

Los miembros del género *Pestivirus* tienen distribución mundial siendo agentes etiológicos de enfermedades infecciosas en animales domésticos de gran importancia económica. La clasificación taxonómica de los *Pestivirus* fue realizada en un principio en base a la especie de la cual se aisló el virus. La nomenclatura actual de los *Pestivirus* fue determinada por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV (*International Committe for Taxonomy of Viruses*)) basándose además de la especie y la signología clínica en análisis filogenéticos de los miembros de este género y de la familia a la que pertenecen. Por lo tanto el género *Pestivirus* forma junto con los géneros *Flavivirus* y *Hepacivirus* la familia *Flaviviridae* y comprende como especies el *Virus de la Fiebre Porcina Clásica* (CSFV), el *Virus de la Diarrea Viral Bovina Tipo 1* (BVDV-1), el *Virus de la Diarrea Viral Bovina Tipo 2* (BVDV-2) y el *Virus de la Enfermedad de las Fronteras en Ovejas* (*Border Disease Virus*) (BDV) (Avalos-Ramirez et al., 2001; Fauquet, 2005). Un aislado de jirafa, fue tomado dentro del género como una presunta quinta especie (Giraffe-1) (Avalos-Ramirez 2012; Avalos Ramirez 2012).

El espectro de especies hospederas de los *Pestivirus* de rumiantes es muy amplia, contrario a CSFV que solo ha sido aislado de cerdos domésticos y silvestres (Laddomada, 2000), BVDV-1 y BVDV-2 han sido aislados de rumiantes silvestres y domésticos así como en cerdos (Thiel et al., 1996; Becher et al., 1997) (Dekker et al., 1995; Vilcek and Belak, 1996; Becher et al., 1999). De tal modo que no hay una división clara en los *Pestivirus* de rumiantes en base a las especies de hospederos (Thiel et al., 1996; Vilcek and Belak, 1997). El aislado Giraffe -1 proviene de una jirafa africana y probablemente el virus circule en rumiantes africanos similares (Becher et al.,

1997; Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 2003; Cedillo Rosales, 2005). El análisis filogenético en base a secuencias nucleotídicas demostró que estos virus aislados posiblemente son integrantes de una nueva especie de *Pestivirus* que muestra semejanzas con BDV (Becher et al., 1999; Avalos-Ramirez et al., 2001; Cedillo Rosales, 2005).

2.2 Biología molecular de los *Pestivirus*

El genoma de los *Pestivirus* está formado por una molécula de cadena sencilla de ácido ribonucleico de polaridad positiva (+ssARN) con un tamaño aproximado de 12.3 Kilobases (Kb). El genoma contiene un marco abierto de lectura “*Open Reading Frame*” (ORF) flanqueado por dos regiones no codificadas (5’NTR y 3’NTR). Las regiones NTR contienen señales importantes para la replicación del genoma viral y la síntesis de proteínas virales (Cedillo Rosales, 2005). El ORF codifica para una poliproteína de cerca de 4000 aminoácidos. Esta poliproteína es procesada durante y después de la traducción por enzimas virales y celulares en las proteínas virales maduras (11 a 12 proteínas) (Colett et al., 1988; Meyers and Thiel, 1996). La región 5’ terminal del ORF codifica la N-terminal proteasa (Npro), la cual se separa del resto de la poliproteína por una acción autocatalítica. En dirección 3’ le siguen los genes para las proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C) y las proteínas de la envoltura E^{tns}, E1, E2 (E proviene del inglés “envelope” (envoltura) y la rns de “Rnase secreted” (Ribonucleasa secretada) (Rumenapf et al., 1993; Meyers and Thiel, 1996; Cedillo Rosales, 2005; Rumenapf, 2008). La región 3’ del ORF codifica para las proteínas no estructurales (“*nonstructural*” NS): p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Meyers and Thiel, 1996). Algunas funciones de las proteínas NS han sido ya aclaradas, de tal

forma, la NS3 posee una función de proteasa, la cual cataliza la el corte entre NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Ryan et al., 1998; Tautz et al., 2000). NS4A presenta una función de cofactor para la proteasa NS3 (Tautz et al., 2000). NS5B finalmente es la ARN-Polimerasa dependiente de ARN (Meyers et al., 1989; Cedillo Rosales, 2005; Rümenapf, 2008).

Existen dos biotipos de *Pestivirus*, de acuerdo al efecto que causan en el cultivo celular (apoptosis) durante su propagación. Los *Pestivirus* del biotipo no citopático (Ncp) se replican sin causar un cambio notable en el cultivo celular. Por el contrario, las cepas citopáticas (cp) inducen apoptosis en las células (Meyers and Thiel, 1996; Goyal et al., 2002; Cedillo Rosales, 2005). En el desarrollo de la forma mortal, “la enfermedad de las mucosas” (“*Mucosal Disease*” MD) se presentan los dos biotipos en los animales afectados y se les ha descrito como virus par (Tautz et al., 1998; Becher et al., 2001; Cedillo Rosales, 2005).

2.3 Presentaciones clínicas de las infecciones por BVDV

BVD/MD es actualmente una de las enfermedades virales de bovinos con más importancia económica a nivel mundial (Houe, 1999). BVDV presenta transmisión de tipo horizontal y vertical. El virus es eliminado a través de secreciones corporales (heces, saliva, entre otros) y su ingreso generalmente es en forma oronasal. Otras fuentes de transmisión horizontal son: a través de semen de toros infectados y en vacunas contaminadas. La transmisión vertical se efectúa a través de infecciones diaplacentales (Thiel et al., 1996). La infección de un bovino no preñado y con el sistema inmune no comprometido tiene generalmente una presentación clínica inaparente o conduce a una enfermedad leve (Thiel et al., 1996; Ridpath et al., 2002).

En los casos agudos pueden observarse signos clínicos como fiebre, depresión, anorexia, diarrea, erosiones o úlceras en tracto digestivo, enfermedades respiratorias, problemas de fertilidad y disminución en la calidad del semen (Thiel et al., 1996; Flores et al., 2000; Becher et al., 2001).

2.3.1 Presentación subclínica de las infecciones por *BVDV*

El 70 a 90% del ganado adulto susceptible puede presentar la forma subclínica de la BVD. El periodo de incubación es de 5 a 7 días aproximadamente luego de lo cual se presenta una ligera fiebre y leucopenia, que usualmente no es notado por el veterinario o ganadero siendo esto seguido por una producción de anticuerpos neutralizantes (Baker, 1987). En general en la mayoría de los casos el *BVDV* no causa enfermedad aparente en animales inmunocompetentes; sin embargo, debido a su rol inmunosupresor el *BVDV* puede potenciar o favorecer el desarrollo de infecciones secundarias, sobre todo aquellas de tipo respiratorio como el complejo respiratorio bovino (Obando et al., 1999). En la mayoría de los casos la *BVDV* permanece sin detectarse en los hatos (Obando et al., 1999).

Las enfermedades que causa el *BVDV* pueden dividirse en 2 grupos: enfermedades que ocurren cuando el feto está infectado y enfermedades que ocurren cuando el ganado se infecta después del nacimiento.

2.3.2 Presentación de las infecciones agudas por *BVDV*

Las infecciones agudas del ganado bovino se producen particularmente en animales jóvenes, y pueden ser clínicamente no aparentes o asociadas con diarrea (Fredriksen et al., 1999). Los animales afectados pueden estar predispuestos a

infecciones concurrentes, por ejemplo enfermedad respiratoria, debido quizás a un efecto inmunosupresor del virus. Los toros pueden sufrir un descenso temporal de fertilidad y mostrar excreción pasajera del virus en el semen (Donis and Dubovi, 1987).

Las vacas pueden padecer también infertilidad, asociada probablemente con alteraciones de la función ovárica (Bosch et al., 1996) y de las secreciones de gonadotropina y progesterona (Bolin and Ridpath, 1992; Bosch et al., 1996). Durante las infecciones agudas, se puede detectar una viremia breve y producirse la excreción nasal del virus. También puede haber una leucopenia transitoria, trombocitopenia o respuesta febril, pero estas manifestaciones varían mucho entre distintos animales. El método más seguro para diagnosticar una infección previa es la presencia de una respuesta serológica. El cuadro clínico es generalmente de alta morbilidad y baja mortalidad, aunque a veces se observan características más graves (Bolin, 1995). En particular, los brotes de la forma grave de la enfermedad aguda con lesiones hemorrágicas, trombocitopenia y elevada mortalidad, se han descrito esporádicamente en algunos países (Bolin, 1995; Endsley et al., 2002) y la infección con los virus de *BVDV-2* se ha demostrado que causa, en particular, una función plaquetaria alterada. Otros brotes agudos pueden mostrar fiebre, neumonía, diarrea y muerte súbita en cualquier grupo de edad, con síntomas hemorrágicos (Baker, 1995b).

A fines de 1980 se presentó una enfermedad aguda en becerros en Norteamérica en relación con infecciones con *BVDV* causando grandes pérdidas económicas. Debido a la presencia de una marcada trombocitopenia y hemorragias masivas en órganos internos y mucosas, se le dio el nombre de Síndrome Hemorrágico (SH) (Corapi et al., 1989; Corapi et al., 1990). En muchos casos fueron aislados virus *BVDV Ncp*, que más tarde se caracterizaron genética y antigénicamente. Estos *Pestivirus* se diferencian claramente de las especies de *Pestivirus* ya conocidas (*BVDV*, *BDV*, *CSFV*) y fue

descrita como *BVDV-2* (Becher et al., 1997; Deregt and Prins, 1998; Becher et al., 1999; Flores et al., 2000; Stoffregen et al., 2000).

2.3.3 Infección congénita

Cuando el ganado está gestante y se infecta el feto, se pueden presentar signos como, muerte embrionaria temprana, infertilidad a intervalos de empadre regulares o irregulares, abortos en cualquier momento de la gestación, mortinatos y fetos momificados, así como becerros con malformaciones debidas a daño cerebral, que pueden estar ciegos, débiles e incapaces de pararse y mamar. Otro tipo de malformaciones pueden observarse en la quijada, piernas inclusive puede presentarse pelo hirsuto. También pueden presentarse becerros que parecen normales pero están débiles o atrofiados (Tautz et al., 1998).

A menudo resulta difícil establecer la confirmación de que el aborto está causado por el *BVDV* (Tautz et al., 1998), pero el virus puede aislarse del tejido fetal en algunos casos, o se puede demostrar la existencia de un antígeno o el genoma vírico. Se debería hacer un intento para detectar anticuerpos específicos en muestras de fluidos o de suero fetal, o en el sobrenadante de una suspensión de tejidos. Los partos en los que el ternero nace muerto o los efectos teratogénicos se pueden asociar con una respuesta inmune fetal activa al virus durante el periodo entre la mitad y el final de la gestación. La madre tendrá a menudo títulos altos de anticuerpos (1/2.000) al *BVDV*, lo que sugiere infección fetal y es debido probablemente a que el feto presente una exposición vírica prolongada (Tautz et al., 1998; Evermann and Ridpath, 2002).

Aunque la infección congénita con *BVDV* conduce a menudo al aborto, esto no se detecta siempre a nivel de campo. La infección durante el primer tercio del periodo

de gestación puede dar como resultado el aborto de un feto pequeño que pase desapercibido para el ganadero. La vaca vuelve a su rutina normal y la incapacidad de mantener la gestación se clasifica como un ejemplo de muerte embrionaria prematura. Otra posible consecuencia de la infección es la muerte y posterior reabsorción de los fluidos del feto lo que produce momificación. Frecuentemente, se observa que los fetos abortados tienen edema subcutáneo y grandes efusiones pleurales y peritoneales. También pueden existir anomalías congénitas que producen retrasos en el crecimiento y defectos selectivos en el sistema nervioso central (SNC), tales como hipoplasia cerebral y desmielinización, y defectos en el ojo, como cataratas. A veces hay defectos esqueléticos, el más avanzado de los cuales es la artrogriposis (Flores et al., 2000).

Los becerros que nacen muertos son una secuela normal de las infecciones congénitas. En general, los becerros parecen estar totalmente desarrollados en el momento del parto, pero no sobreviven. Después de 150 días de gestación, se desarrollará el sistema inmune del feto y la infección del feto resultará en una respuesta de anticuerpos y en el nacimiento de un ternero normal (Fredriksen et al., 1999; Flores et al., 2000).

2.3.4 Complejo Respiratorio Bovino

La infección con *BVDV* en animales inmunocompetentes y seronegativos tiene poca importancia; pero sí como un agente inmunosupresor. El *BVDV* potencia a otras virus y bacterias como: *Parainfluenza tipo 3*, *BoHV-1*, *Coronavirus*, *Rotavirus*, *Pasteurella spp.*, *Salmonella spp.*, *Coccidia*, etc.; produciendo un cuadro de enfermedad respiratoria severa denominado Síndrome del Complejo Respiratorio Bovino (ERB),

que es uno de los problemas causantes de grandes pérdidas económicas en el mundo (Fulton et al., 2009b).

En condiciones de engorde o corral, *BVDV* representa una contribución significativa en el ERB, incluyendo la neumonía. Dos estudios informaron que el 0.4% y 0.3% de los corrales de engorda presentaron animales PI con *BVDV* (Loneragan et al., 2005; Fulton et al., 2006). En estos estudios anteriores el 15.9% de los casos iniciales de ERB se atribuyó a la exposición a becerros PI (Loneragan et al., 2005). Un alto nivel de inmunidad frente a *BVDV* en la entrada a los corrales de engorda se asoció con una mayor protección contra el ERB y resultando en grandes beneficios económicos. Los becerros con altas concentraciones de anticuerpos del *BVDV* tenían menores tasas de morbilidad ERB, reduciendo el costo de los tratamientos, y un menor número de tratamientos para la ERB (Fulton et al., 2002; Loneragan et al., 2005).

2.3.5 Diarrea Viral Bovina en becerros recién nacidos

El *BVDV*, raramente causa enfermedad en animales menores de 6 meses de edad. Los becerros recién nacidos infectados con *BVDV* pueden padecer de severas enteritis que son ocasionalmente de curso fatal (Baker, 1995b). Experimentalmente se ha demostrado que en becerros que tomaron tarde el calostro, la infección que resulto fue una enfermedad clínica benigna con rápido restablecimiento (Baker, 1995b).

2.3.6 Síndrome Hemorrágico

En EUA y Canadá, se han reportado como severos, en estos casos se observa diarrea con sangre, epistaxis, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias petequiales y equimóticas en mucosas, los animales muestran pirexia, leucopenia,

linfopenia y neutropenia. Este síndrome ha sido asociado con infecciones por cepas Ncp del genotipo 2 (Ridpath et al., 2000).

2.3.7 Producción de animales persistentemente infectados

Infecciones con virus *BVDV* Ncp tienen diferentes repercusiones en animales preñados de acuerdo al tiempo en el que se presenta la infección. De tal forma que, una infección en la gestación puede producir la reabsorción del embrión, deformaciones (en ojos), hipoplasia cerebelosa, abortos, fetos muertos al nacimiento y nacimiento de becerros muy débiles (Van Oirschot, 1983; Becher et al., 1997). La transmisión diaplacental del virus entre los días 40 y 120 de la preñez puede dar origen a la infección persistente del feto. Los animales afectados permanecen después del nacimiento para toda la vida persistentemente infectados (animales PI) (Van Oirschot, 1983; Scherer et al., 2001). Estos animales PI son de central importancia en la epidemiología de *BVDV* ya que excretan de manera continua el virus y son los reservorios de este virus en la población bovina (Scherer et al., 2001).

La identificación de estos animales se hace mediante la detección del *BVDV* no citopático la sangre. El virus puede identificarse en la piel por inmunohistoquímica. Los animales con viremia persistente carecen también de anticuerpos específicos y el diagnóstico en el ternero joven, de hasta aproximadamente 3 meses, puede ser incorrecto por la presencia de anticuerpos maternos al *BVDV* (Ridpath et al., 2009). El anticuerpo materno también puede interferir con el aislamiento del virus. En animales mayores con viremia persistente, pueden estar presentes niveles bajos de anticuerpo debido a su habilidad para seroconvertir a cepas de *BVDV* (incluyendo vacunas) "heterólogas" (antigénicamente diferente) del virus persistente (Vilcek et al., 2005; Ridpath et al., 2009). Para confirmar un diagnóstico de viremia persistente, los animales

deben de volver a someterse a pruebas después de un intervalo de, al menos, 3 semanas (Vilcek et al., 2005).

Los animales PI que desarrollen el cuadro específico de *BVDV*, Enfermedad de las mucosas (EM) puede presentarse en 2 formas clínicas:

1.- Aguda, en donde se presenta fiebre alta, depresión, diarrea, la cual puede ser sanguinolenta, lesiones en la boca, que los hacen producir saliva en exceso. El ganado afectado por ésta forma de EM, generalmente muere entre 5 y 10 días sin importar que tratamiento se utilice. La EM aguda presenta signos muy similares a los de la *BVDV* Aguda y es necesario análisis de laboratorio para diferenciarlas (Vilcek et al., 2005; Bachofen et al., 2009).

2.- En la enfermedad de las mucosas crónica, se puede observar fiebre ligera, los animales se van consumiendo poco a poco, diarreas intermitentes, pezuñas malformadas y lesiones en la piel, éstos animales pueden vivir durante semanas antes de morir. Por lo anterior se puede observar que las lesiones en el ternero virémico son no patognomónicas (Bachofen et al., 2009). Los síntomas clínicos varían desde un animal sano y aparentemente normal a un becerro débil y con dificultad para mantenerse en pie y mamar. Estos últimos becerros pueden mostrar defectos en el SNC, como temblores musculares, incoordinación y ceguera. A menudo mueren en días cercanos a su nacimiento, contribuyendo por tanto al "síndrome del becerro débil" (Bachofen et al., 2009).

Algunos becerros virémicos sobreviven hasta la madurez sexual y se retienen para reproducción. Los becerros nacidos de estas madres infectadas son siempre persistentemente virémicos, y a menudo son débiles en el momento de nacer y no se desarrollan. Los animales virémicos persistentes son una fuente continua de virus infeccioso para el resto del ganado, y por lo tanto se requiere su identificación rápida y

su retirada del hato. En los animales para comercio, se debe comprobar la ausencia de viremia persistente por *BVDV* (Houe et al., 2006; Bachofen et al., 2009).

Los toros con infección persistente generalmente tienen un semen altamente infeccioso y de baja calidad, en consecuencia, una fertilidad reducida (Van Oirschot, 1983). Todos los toros destinados a inseminación natural o artificial deberían ser sometidos a pruebas para detectar infección persistente por *BVDV* (Houe et al., 2006; Bachofen et al., 2009).

Las hembras usadas como receptoras de embriones deberían ser siempre negativas en cuanto a viremia por *BVDV* antes de su primera recepción. Las vacas donantes infectadas persistentemente con *BVDV* representan también una fuente de infección potencial, ya que los ovocitos sin zona pelúcida intacta se muestran susceptibles a la infección *in vitro* (Van Oirschot, 1983; OIE, 2004). Los embriones también pueden resultar contaminados después de una infección aguda del donante. Los productos biológicos utilizados para técnicas de fertilización *in vitro* (suero bovino, cultivos celulares bovinos) tienen un alto riesgo de contaminación y deberían examinarse para detectar *BVDV* (Fulton et al., 2009b). Incidentes recientes de introducción aparente del *BVDV* a través de tales técnicas han puesto de manifiesto este riesgo (OIE, 2004; Fulton et al., 2009b). Se considera esencial que los suplementos de suero utilizados en los medios se esterilicen como se detalla en el Artículo 3.3.1.5 del *Código de Salud para Animales Terrestres de la OIE (Código de Animales Terrestres)* y como se resume en la Sección B.1.a. de este capítulo. Los países importadores pueden pedir pruebas adicionales para confirmar la esterilidad del suero, detalladas en el Artículo 3.3.1.6 del *Código de Animales Terrestres de la OIE* (OIE, 2004).

Por lo tanto, infecciones del tracto reproductivo que resultan en infecciones fetales con cepas Ncp en las vaquillas así como en vacas, es un factor importante en la

enfermedad reproductiva, pero es más importante por la producción de animales PI (Fulton et al., 2009b).

Si los animales PI nacen vivos, son inmunotolerantes de la cepa infectante y diseminan el virus durante toda su vida (Baker, 1995a; Fulton et al., 2006). Es probable que estos animales sean el reservorio más importante de virus para el ganado susceptible, estudios avalan que el 70% al 100% de vacas susceptibles, no vacunadas se infectaron después de la exposición a becerros PI (Fulton et al., 2005; Fulton et al., 2006).

2.3.8 Presentación clínica de la Enfermedad de las Mucosas

Una infección persistente en un animal es condición para la presentación de la enfermedad mortal llamada “Enfermedad de las Mucosas” (Tautz et al., 1998). La MD solamente se presenta en animales PI de edades entre 6 y 24 meses, y es caracterizada por una baja morbilidad pero una alta letalidad. En la presentación de la forma aguda de MD los animales mueren dentro de las primeras dos semanas después de la presentación de los primeros síntomas. Síntomas clínicos son fiebre, anorexia, letargia, secreción nasal, diarrea hemorrágica profusa y deshidratación. Se observan en tracto digestivo ulceraciones, necrosis y destrucción de tejido linfático (Tautz et al., 1998; Becher et al., 2001; Rügenapf, 2008). Se ha demostrado que este síndrome está asociado con la presencia del biotipo citopatogénico, que puede surgir bien por superinfección, recombinación entre biotipos no citopatogénicos, o por mutación del biotipo persistente (Tautz et al., 1998; Becher et al., 2001). Consecuentemente, el diagnóstico confirmativo de la enfermedad mucosal debería incluir el aislamiento del virus citopatogénico del ganado afectado. Este biotipo puede a veces aislarse de la sangre, pero se puede recuperar más repetidamente de otros tejidos, en particular del tejido intestinal y de las

placas de Peyer (Tautz et al., 1998; Becher et al., 2001). El aislamiento del virus también puede realizarse fácilmente del bazo. Éste órgano es fácil de recoger y raras veces es tóxico para el cultivo de células después de su preparación para el aislamiento vírico (Baker, 1995a; OIE, 2004).

El aislamiento de las muestras de intestino puede resultar difícil si se ha producido autólisis; en este caso deberían probarse suspensiones de nódulos linfáticos o amígdalas (Baker, 1995a; OIE, 2004). El virus no citopatogénico puede también detectarse, particularmente en la sangre o en órganos asociados a la sangre. Para detectar antígenos víricos por inmunofluorescencia o marcadores con inmunoperoxidasa se pueden teñir cortes de tejido congelado de casos de enfermedad mucosal (OIE, 2004).

La enfermedad mucosal es invariablemente mortal. Su aparición puede ser tan rápida que los primeros síntomas que se ven sean animales muertos o moribundos (Rümenapf, 2008). Sin embargo, es más común que los animales se vuelvan anoréxicos durante un periodo de varios días, en los que se les ve apáticos, y con signos de dolor abdominal. Pueden desarrollar una diarrea profusa y perder rápidamente peso. Se pueden apreciar a menudo erosiones en la boca, particularmente a lo largo del margen gingival. Se produce lacrimación y salivación excesiva. Generalmente, los casos de enfermedad mucosal son esporádicos y raros (Baker, 1995a; OIE, 2004).

El examen postmortem revela erosiones en varias partes de la mucosa a lo largo del tracto gastrointestinal. Las más llamativas son las que se encuentran por encima de las placas linfoides de Peyer en el intestino delgado y en los nódulos linfoides del colon. En un examen histológico hay una clara demostración de destrucción del tejido linfoide asociado al intestino. La mayoría de las células linfoides de las Placas de Peyer se lisan

y reemplazan por células inflamatorias, restos y células del epitelio superior colapsado (OIE, 2004).

La infección aguda grave por *BVDV* puede ser clínicamente similar a la enfermedad de las mucosas y se puede producir confusión, particularmente cuando están afectados varios animales. La enfermedad de las mucosas puede producirse entre poblaciones de animales infectados persistentemente cuando se lleva a cabo una sincronización del estro. La diferenciación requiere un examen cuidadoso de historias clínicas y pruebas de detección de anticuerpos así, como de antígenos o de virus entre los animales infectados y los recuperados. La seroconversión entre animales recuperados es indicativa de infección aguda, mientras que resultados positivos a dos antígenos o a virus con las muestras de un animal infectado, tomadas con una separación de 3 semanas, constituye un diagnóstico de la enfermedad de las mucosas. Generalmente, los animales con MD son negativos para anticuerpos, aunque a veces se pueden detectar niveles bajos de anticuerpos (Baker, 1995a; OIE, 2004).

2.4 Diagnóstico de las infecciones por *BVDV*

Dado que no existen signos clínicos patognomónicos de la infección por *BVDV* en bovinos, las estrategias para el diagnóstico dependen fundamentalmente de pruebas de laboratorio. El diagnóstico de laboratorio de infecciones con *BVDV* puede realizarse indirectamente a partir de la detección de anticuerpos antivirales, así como directamente a través de la detección del viriones o partes virales como proteína y ARN (Sandvik, 1999). Sin embargo la prueba de oro (gold standard) para el *BVDV* sigue siendo el aislamiento viral en cultivo celular seguido de pruebas confirmatorias específicas como la inmunodetección (inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa), usadas para la confirmación de cepas citopáticas, así como para la detección de cepas no citopáticas (Sandvik, 1999). Así mismo, se ha utilizado como prueba confirmatoria la Reversa

Transcriptasa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) que han alcanzado una creciente importancia en el diagnóstico del *BVDV* tanto en la modalidad de punto final como tiempo real (Sandvik, 1999). El RT-PCR es una prueba muy específica para el diagnóstico del virus y es considerada una prueba estándar, la base de esta prueba descansa en la amplificación de secuencias genómicas del virus en diferentes muestras biológicas, para lo cual se emplean oligonucleótidos, que son secuencias complementarias artificiales del genoma viral, lo que la hace una prueba altamente específica (Goyal et al., 2002; Domínguez, 2009).

La selección de la prueba diagnóstica debe estar ligada directamente con los objetivos que se requieren cumplir (monitoreo, control, erradicación)(Domínguez, 2009).

2.4.1 Diagnóstico a través de las manifestaciones clínicas de las infecciones por *BVDV*

El diagnóstico clínico se basa en la historia, signos y lesiones. La enfermedad aguda en general cursa como una infección subclínica que pasa inadvertida en la mayoría de los hatos (Baker, 1995b), sin embargo puede hacerse evidente en algunas circunstancias. Los animales pueden evidenciarse febriles, inapetentes, presentar problemas respiratorios, leucopenia, y diarrea, así como ulceraciones y erosiones de la mucosa oral. Algunos animales también evidencian lesiones pódalas (úlceras interdigitales e inflamación del rodete coronario). El aborto como consecuencia de la infección con *BVDV* puede suceder desde unos días hasta varias semanas después de la infección sub-clínica o enfermedad clínica, sin embargo no es suficiente para efectuar

un diagnóstico. Para llegar a un diagnóstico definitivo se requiere de pruebas de laboratorio específicas para *BVDV* (Houe, 1999; Cotrino, 2003).

2.4.2 Diagnóstico a través de la detección de anticuerpos anti-*BVDV*

Las pruebas serológicas han sido un buen indicativo para la detección de la presencia del virus en las poblaciones bovinas y tienen amplia acogida. Entre las pruebas serológicas más importantes se destacan:

2.4.2.1 Seroneutralización

La seroneutralización viral se basa en la determinación de anticuerpos neutralizantes contra el virus que aparece en el suero de los animales post-infección. La aparición de anticuerpos contra *BVDV* en animales que anteriormente eran seronegativos, o bien un incremento mayor a 4 veces del título de anticuerpos séricos son un indicativo de una infección aguda (Houe, 1999; Cotrino, 2003). Esta técnica es realizada en placas de micro titulación utilizando como indicador de infección de cultivos celulares en donde se puede evidenciar la multiplicación del virus (virus citopáticos que forman placas citopáticas (CPE)) a falta de anticuerpos neutralizantes o la falta de estas cuando existen anticuerpos neutralizantes. Diversas cepas de referencia e inclusive cepas regionales son usadas para realizar esta técnica, entre estas, “Oregon C24V” y “NADL”. El título de anticuerpos en el suero puede determinarse como la recíproca de la dilución más alta de cada suero en la cual el virus es neutralizado en el 50% de los pocillos (TCID₅₀) (Cotrino, 2003; Lértora, 2003).

2.4.2.2 Prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra BVDV

Dentro de las más sensibles se encuentra el ELISA, que tiene como objetivo determinar de forma indirecta (anticuerpos) la presencia del virus y para ello existen diferentes formatos de la técnica, dentro de los cuales el ELISA por competencia muestra una sensibilidad y especificidad alta comparada con el formato indirecto; por otra parte, los anticuerpos presentes en el animal en el momento de realizar la prueba pueden provenir de diferentes fuentes entre ellas infecciones con cepas silvestres o son generados a partir de la aplicación de vacunas, aunado a esto solamente se puede establecer que el animal tuvo contacto con el virus sin embargo no se puede establecer si el animal aún esta infectado (Sandvik, 2004; Domínguez, 2009). Con esta prueba se detectan anticuerpos sin embargo no se puede determinar a través de ésta si los anticuerpos tienen actividad de neutralizar al virus antes de que éstos infecten un organismo (Sandvik, 2004; Domínguez, 2009).

Es una prueba sensible, rápida, confiable y económica para diagnóstico serológico de infección por *BVDV* en hatos. La prueba de ELISA para el *BVDV* está diseñada para detectar anticuerpos específicos en muestras de suero, plasma y leche (Sandvik, 2004; Domínguez, 2009; Rivera G., 2008). ELISA basados en anticuerpos policlonales dirigidos contra varias proteínas y glicoproteínas de cepas antigénicamente diferentes, son capaces de detectar una amplia variedad de *BVDV* (Sandvik, 2004; Domínguez, 2009; Rivera G., 2008).

2.4.3 Detección de virus o partículas virales

Para detectar a los bovinos con infecciones agudas o persistentes por *BVDV* existen diferentes métodos entre los que detectan la presencia del virón (aislamiento viral, microscopia electrónica), así como partes del mismo (genoma-RT-PCR; proteínas

del virus con inmunohistoquímica, inmunofluorescencia indirecta, ELISA de antígeno)(OIE, 2004).

2.4.3.1 Aislamiento viral en cultivos celulares

El aislamiento del virus es considerada la técnica más fiable de detección de virus (Goyal et al., 2002; Houe et al., 2006), denominada la prueba de oro usada para el diagnóstico de *BVDV*, 100% específica y altamente sensible (Houe et al., 2006). El virus puede ser aislado de sangre, ya sea libre en suero o plasma y a partir asociado a células a partir de coagulo y o de leucocitos (OIE, 2004). A la necropsia puede aislarse el virus a partir de todos los órganos, principalmente de los órganos linfoides como timo, bazo, Placas de Peyer (Brownlie et al., 1995; OIE, 2004). Los animales PI presentan altos títulos virales en sangre y el virus puede ser aislado prácticamente desde todos los órganos. En los toros PI el virus también puede ser aislado de semen (Brownlie et al., 1995; OIE, 2004). El aislamiento de virus de una muestra de sangre de un animal vivo puede indicar infección aguda o infección persistente y la diferenciación se puede determinar por una segunda muestra tomada dentro de un período posterior a 21 días a la primera toma o muestreo (muestreo pareado), debido a que en animales con infección aguda los niveles de viremia son detectables por un breve período de 2 a 3 semanas (Brownlie et al., 1995; OIE, 2004).

Los cultivos celulares varían en su susceptibilidad a diferentes virus, por lo que se debe incluir el tipo celular más susceptible al virus en la muestra. Para el *BVDV* las líneas celulares de elección son: MDBK, EBTr (NBL-4) y algunas líneas celulares de otros rumiantes como ovinos o caprinos (OIE, 2004; Dieguez et al., 2009). Para el aislamiento celular es importante que las líneas celulares sean permisivas al virus y la infección sea efectiva (producción de viriones). En estos casos se ha observado que

viriones obtenidos a partir de una infección en una especie pueden replicarse mejor en líneas celulares provenientes de la misma especie animal. Por ejemplo *BVDV* se replica con mejores títulos en líneas provenientes de bovinos, así mismo *Pestivirus* provenientes de rumiantes silvestres se replican con mayor título en cultivos celulares de ovejas (comunicación personal). Por tal motivo algunos laboratorios prefieren hacer el aislamiento primario a partir de muestras en 2 líneas celulares de rumiantes (MBDK y EBTr). (OIE, 2004; Dieguez et al., 2009).

Debido a que un alto porcentaje de los virus *BVDV* son de tipo no citopático (Ncp) no se observaran lesiones en células infectadas por el mismo, por lo que para comprobar la replicación del virus es necesario una segunda técnica comprobatoria o diagnóstica que detecte proteínas o genoma (OIE, 2004). Entre las técnicas más comunes se encuentran la inmunodetección con anticuerpos específicos (Inmunofluorescencia Indirecta y la Inmunoperoxidasa Indirecta), así mismo la detección de parte del genoma mediante RT-PCR (Bitsch et al., 2000).

Cuando el virus es citopático es importante distinguir con una segunda técnica comprobatoria ya que las placas citopáticas (CPE) que desarrolla *BVDV* son similares a las desarrolladas por otros virus citopáticos (Bitsch et al., 2000).

Tanto el manejo del equipo, como el material y los reactivos usados para cultivo deben hacerse bajo normas de bioseguridad que eviten la contaminación por hongos como bacterias. La contaminación de material biológico (células y sueros fetales) con virus no citopáticos o con anticuerpos debe evitarse, ya que se pueden dar resultados falsos positivos y negativos (Bitsch et al., 2000; OIE, 2004; Houe et al., 2006).

Se debe observar los cultivos cada día para verificar la presencia de efecto citopático, lo cual se verifica comparando con los controles positivos y negativos que

deben incluirse con cada aislamiento. Se debe mantener el cultivo por lo menos durante dos semanas bajo observación, antes de dar una muestra como negativa (OIE, 2004).

2.4.4 Inmunodetección en cultivo celular

Dentro de estas técnicas implica el uso de anticuerpos mono o policlonales para detectar un antígeno del virus dentro del cultivo celular y demostrar el aislamiento y replicación del virus. En estas técnicas se pueden utilizar anticuerpos monoclonales o policlonales específicos contra *BVDV* marcados directamente con algún fluorocromo (inmunofluorescencia directa) o marcados con alguna enzima como peroxidasa (inmunoperoxidasa directa). Pero el método más común son los métodos indirectos los cuales utilizan un segundo anticuerpo marcado con un fluorocromo o peroxidasa específico contra el primer anticuerpo (inmunofluorescencia indirecta o inmunoperoxidasa indirecta) (Harlow and Lane, 1999; OIE, 2004) .

2.4.4.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para antígeno de *BVDV* en cultivo celular

Es una prueba simple, rápida y altamente sensible, se detectan proteínas como NS2-3 y E2 del *BVDV*, utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales específicos dirigidos contra la proteína seleccionada del virus. Entre los anticuerpos más usados para IFI son los monoclonales específicos contra *BVDV*, que se producen en hibridomas murinos por lo que se utiliza un anticuerpo anti-ratón marcado con fluorocromos (FITC, CY3, entre otros) para evidenciar la interacción monoclonal-proteína de *BVDV* (Harlow and Lane, 1999; OIE, 2004). Resultados positivos se observan cuando dentro del cultivo una célula posee fluorescencia en su citoplasma (Harlow and Lane, 1999).

2.4.4.2 Inmunoperoxidasa indirecta para *BVDV* en cultivo celular

Es una prueba inmunodetección rápida para detectar antígenos virales una vez que se multiplica el virus en cultivos celulares. Esta prueba es similar a la IF, pero en este caso el anticuerpo monoclonal o policlonal (IPO directa) o un anticuerpo anti especie (IPO indirecta) está marcado a una enzima (la peroxidasa), la cual degrada un sustrato específico que permite un cambio de coloración en muestras positivas. La lectura del resultado de esta se realiza mediante un microscopio invertido de campo claro observando un precipitado de color oscuro en el citoplasma de la célula infectada (Harlow and Lane, 1999; Lértora, 2003; OIE, 2004).

2.4.4.3 Inmunohistoquímica (IHQ):

La IHQ se realiza, rutinariamente, en tejido fijado en formalina y embebido en parafina, aventajando a otras técnicas en términos de conveniencia en la remisión de las muestras, posibilita el estudio retrospectivo de muestras enviadas para examen histopatológico y permite una precisa asociación entre el antígeno viral con tipos celulares y lesiones histológicas (OIE, 2004; Givens et al., 2009). En esta técnica una vez fijado y montado el tejido se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para proteínas de *BVDV* y un segundo anticuerpo anti especie marcado con fluorocromos o peroxidasa. Las dificultades de esta técnica son similares a las descritas tanto en IFI y/o IPOI.

La IHQ de tejidos fijados en formalina es el método diagnóstico más conveniente para la detección animales persistentemente infectados con *BVDV* y el tejido usado para este fin son las muescas de oreja al momento de aretar. (Lindberg et

al., 2006). También se utiliza esta técnica al momento de la necropsia como prueba confirmatoria de una infección por *BVDV* (OIE, 2004).

2.4.5 Detección del ácido nucleico viral:

2.4.5.1 Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR):

Es un método rápido, sensible, que detecta diversos tipos y biotipos de *BVDV* y permite investigar un gran número de muestras en corto tiempo. Su sensibilidad permite detectar el virus en pool de muestras de sangre y leche de tanque, muestras combinadas de suero o plasma de animales infectados de forma transitoria, así como los animales PI (Houe et al., 2006; Rümenapf, 2008); sin embargo, si no se manejan adecuadas medidas de bioseguridad al momento de desarrollar la técnica puede originar resultados falsos positivos (Lértora, 2003; Houe et al., 2006).

Para el *BVDV*, que posee ARN en su genoma, se utiliza la técnica de RT-PCR en la cual se convierte el ARN en una copia de ADN, por acción de la enzima transcriptasa reversa, y posteriormente se amplifica este ADN con la ADN-polimerasa (Rümenapf, 2008). La sensibilidad y especificidad de la técnica están estrechamente relacionadas con el diseño de los iniciadores (oligonucleótidos) (Lértora, 2003; Tajima, 2004). Cuando la metodología se aplica a muestras clínicas algunos laboratorios utilizan complementando la RT-PCR con PCR anidados y semianidados, estos incrementan la sensibilidad e inclusive, si así son diseñados, la especificidad de la técnica (Lértora, 2003; Tajima, 2004).

Según Lértora 2003 y Tajima 2004, para la realización de la prueba, siempre se utilizan controles positivos, negativos y de contaminación. Los productos amplificados se someten a electroforesis en geles de 2% agarosa y se visualizan por tinción con

bromuro de etidio y exposición a la luz UV, los productos también pueden ser visualizados por separación mediante geles de poliacrilamida con tinción de plata (Lértora, 2003; Tajima, 2004; Rügenapf, 2008).

Otra variante del PCR utilizada para el diagnóstico para *BVDV* es el RT-PCR en tiempo real (cuantitativo). Este disminuye la posible contaminación (falsos positivos) y con un buen diseño de iniciadores y sondas posee una mayor especificidad y sensibilidad que el PCR punto final. Sin embargo el equipo y el material utilizado en esta técnica tienen un costo superior a la técnica convencional.

2.5 Programa de control y erradicación para *BVDV/MD*

Una parte central en los programas de control y erradicación para *BVDV/MD* es el reconocimiento y eliminación de animales PI (Lindberg and Alenius, 1999; Nuotio et al., 1999; Bitsch et al., 2000). Campañas de control y erradicación de *BVDV* han funcionado exitosamente en países escandinavos, que se encuentran libres de ésta enfermedad (Nuotio et al., 1999; Valle et al., 2001). En otros países principalmente europeos, se realizan campañas de tipo voluntario. En estas campañas se determina en primer lugar, el estatus del hato mediante métodos serológicos, siguiendo con el análisis virológico del hato, el cual tiene la finalidad de reconocer y eliminar los animales PI (Weber and Verhoeff, 2001; Rossmannith et al., 2009). Además de esto, el empleo de vacunas inactivas o vivas son una parte importante de estos lineamientos. Una parte fundamental del empleo de vacunas es evitar la transmisión vía placenta del virus (protección fetal) y por lo tanto impedir la producción de animales PI (van Oirschot, 1999; van Oirschot et al., 1999). En algunos países solo se permite el uso de vacunas con virus pertenecientes a los subgrupos *BVDV-1a* o *1b* (Reddy et al., 1995; van Oirschot et al., 1999; Becher et al., 2001). Estas vacunas confieren una protección

parcial contra enfermedades inducidas por *BVDV-2*. Hasta ahora no está claro hasta qué punto confiere protección contra otros subgrupos de *BVDV-1* e inclusive contra subtipos de la especie *BVDV-2*. Esto ha generado que en los últimos años se produzcan vacunas con cepas de ambos tipos y biotipos, sin embargo no hay evidencia al menos publicada de la eficacia de las mismas y sobretodo que confieran una mayor protección contra cepas específicas de una región (Reddy et al., 1995; Becher et al., 2001).

En los programas de control, el rendimiento de una prueba de diagnóstico, en cuanto a sensibilidad y especificidad, es altamente dependiente de los objetivos del programa. Por ejemplo, la detección de anticuerpos en la leche a granel es útil en el cribado inicial para la clasificación de la condición de rebaño, pero no es útil para el seguimiento de un rebaño recién destetado para reconfirmar su estado o detectar la reinfección. Herramientas de diagnóstico disponibles deben ser evaluadas de acuerdo a los objetivos específicos o de fase en el programa de control o erradicación en el nivel de hato y de la región (Houe et al., 2006).

Los principales componentes de diagnóstico de los programas de control del *BVDV* (objetivos o fases) se pueden clasificar de la siguiente manera según Houe 2006: 1) las pruebas iniciales para clasificar el estado del rebaño, 2) pruebas de seguimiento para identificar los animales infectados individuales en los rebaños infectados, 3) el seguimiento continuo para confirmar la infección condición de zona libre.

Para poder realizar el seguimiento de estas fases se puede utilizar la prueba de ELISA de antígeno como de anticuerpo como métodos de diagnóstico, ya que resulta una prueba fácil, económica, se puede realizar en un gran número de animales de forma simultánea y son altamente sensibles como específicas (Houe et al., 2006).

En México, hay evidencia serológica desde hace varios años de la presencia de *Pestivirus* en rumiantes, se tiene evidencia clínica e inclusive a nivel patológico hay sugerencia de que el virus se encuentra circulando en rumiantes de nuestro país (ASERCA, 1995; Avalos-Ramirez et al., 2001; Domínguez, 2009; Avalos Ramirez 2012). El sistema vaca-cría en el estado de Nuevo León se desarrolla en diversas condiciones agro-ecológicas, influenciadas principalmente por los factores climáticos. Esta variabilidad microclimática no permite que la explotación bovina sea homogénea, igualmente la tecnología aplicada es muy variable, existiendo desde las explotaciones tradicionales hasta las que utilizan tecnología de vanguardia (Avalos Ramirez 2012). Bajo este principio, la ocurrencia de enfermedades reproductivas en el ganado obedece a las interacciones entre factores ambientales, de manejo y propios del bovino. Los patógenos que se han detectado en distintos estudios relacionados frecuentemente con trastornos reproductivos son el *Virus de la Diarrea Viral Bovina*, así como el *Herpesvirus Bovino tipo 1*, *Leptospira spp.* y *Neospora caninum*, entre varios otros (Avalos Ramirez 2012). La infección por *BVDV* es persistente en la población bovina debido a la intervención de otras especies animales como hospedadores, adaptación del huésped al sistema inmune del hospedador, infección de la prole, falta de información para los productores sobre el comportamiento de la infección y las alternativas diagnósticas, falta de adopción de prácticas de bioseguridad (ASERCA, 1995; Domínguez, 2009).

El empleo de técnicas moleculares para la detección del material genético de *Pestivirus* en rumiantes ha revelado la presencia del virus en hatos bovinos de México. Se han reportado seroprevalencias que oscilan entre 60% y 85% para ganado de carne y bajo el mismo sistema han descrito una prevalencia para animales PI entre 0.5% y 2% (Avalos-Ramirez et al., 2001; Domínguez, 2009; Avalos Ramirez 2012). En sistemas

semi-intensivo con pastoreo en praderas del trópico en ganado de carne se ha descrito una seroprevalencia de 14% en el estado de Yucatán (Avalos Ramirez 2012). En el estado de Nuevo León se ha descrito una seroprevalencia que oscila entre 28.5% y 67.8% para el sistema vaca-cría que se ha desarrollado en explotaciones de tipo semi-intensivo (Domínguez, 2009; Avalos Ramirez 2012).

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Equipo y material consumible

- Campana de flujo LABCONCO® Purifier class II Biosafety Cabinet (delta series)
- Incubadora O₂/CO₂ SANYO®
- Baño María (37 °C)
- Centrífuga refrigerada BIOMETRIX® MICRO 17TR.
- Microscopio óptico invertido AXIOVET 40C ZEISS®
- Microscopio óptico invertido LEICA®
- Refrigerador 2 – 4 °C
- Ultra congeladores de -20°C, -80°C y 150°C
- Micropipetas Bio/Pet (1000/100 µl); (200/20 µl); (100/10 µl); (10/0,5 µl)
- Auxiliar de pipetas
- Microscopio óptico invertido
- Tanque de criopreservación (nitrógeno líquido)
- Tubos de polipropileno de microcentrífuga
- Bloque térmico (55-60 °C)
- Platina térmica
- Cajas de Petra para cultivo celular.
- Placas de 6/24/48/96 pozos.
- Puntillas desechables para micropipetas de 10, 20, 200, 1000 µl
- Pipetas serológicas estériles

3.1.2 Material biológico

- Células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) proporcionadas por PRONABIVE.
- Suero Equino (SE) GIBCO® Invitrogen®
- Cepa NADL proporcionado por PRONABIVE (ATCC: VR-534).
- Anticuerpo monoclonal para la detección de *Pestivirus* CODE 7 (Dubovi, 1994).

3.1.3 Cultivo celular y aislamiento viral

- Medios de Cultivo DMEM/12 (1:1) Nutrient mixture F-12 (HAM) 1X.
“Dulbecco’s Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12.
- Antibiótico y antimicótico (100X) GIBCO® Invitrogen®.

3.1.4 Reactivos y estuches comerciales y enzimas

3.1.4.1 Para la extracción de ARN a partir de muestras clínicas

- Cloroformo
- Alcohol isopropílico
- Etanol 75% (en agua tratada con DEPC)
- Agua libre de RNasa o SDS 0,5%
- Trizol Tri-Reagent® (RNA/DNA/PROTEIN ISOLATION REAGENT de Invitrogen®).

3.1.4.2 RT-PCR, PCR y electroforesis

- Agua ddDEPC: H₂O estéril, libre de nucleasas incluido en el Kit de RT-PCR one step Kit AccessQuick™ de PROMEGA®
- Agua ddPCR: H₂O doblemente desionizada (bidestilada) y esterilizada en autoclave para RT-PCR (Roche).
- SuperScript III One Step RT-PCR System (Invitrogen®).
- Supermix PCR (Invitrogen®).
- Solución de agarosa: 1.5 % (w/v) en Buffer SB.
- Buffer de corrimiento para ADN/ARN: SB 1X
- Marcador de peso molecular para ADN: (1 Kb o 100 pb DNA ladder; Fa. Gibco
- Buffer SB 1X (buffer de electroforesis).
- Bromuro de etidio: 10 mg/ml bromuro de etidio solución concentrada (Fa. Fluka), conservar a 4°C.

3.1.4.3 Inmunoperoxidasa indirecta

- Solución fijado celular; Paraformaldehído 2%.
- Solución de permeabilizado; Tritón 2%
- Buffer de lavado celular PBS 1X (agua bidestilada más PBS al 10X).
- Inmunoperoxidasa “BIVE KITS” Detección de anticuerpos; Productora Nacional de Biológicos Veterinarios®.
 - Solución “A” (Fosfato de sodio 0.5 M).
 - Solución “B” (Ácido Cítrico 0.1 M).
 - SAF “D” 5X.
 - Proteína G conjugada con Peroxidasa
 - Indicador de Peroxidasa (3-amino-9etil-carbazol).
 - Sustrato de Peroxidasa (Peróxido de Hidrógeno 30%).

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Lugar de trabajo

Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio Central Regional de Monterrey, perteneciente al Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León, Guadalupe, Nuevo León, México y en el Departamento de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

3.2.2 Aislamiento viral

Para el aislamiento viral se utilizó una línea celular establecida MDBK, libre de *Pestivirus*, cultivada en placas de 96 pozos con medio DMEM/F12 suplementado con 10% SE y 1% antibiótico (sulfato de estreptomicina 0.5-1.5% en 100x, penicilina G sódica 0.5-1.5% en 100x) y antimicótico (Anfotericina B 0.1% en 100x) (Gibco, Invitrogen[®]) que para el momento de la infección alcanzara una confluencia del 70-80% (250,000 células por pozo). Para llevar a cabo la infección celular se desechó el sobrenadante de las placas y se agregaron 50 µl de cada grupo de sueros por pozo, las células se incubaron por 1 hora, posteriormente se agregó 150 µl de medio DMEM/F12 suplementado (10% SE, 1% antibiótico y antimicótico). Como control negativo se utilizó un suero negativo a *BVDV*, así como un control de contaminación (medio sin muestra). Como control positivo se utilizó 100 TCID₅₀ en 50 µl de medio de la cepa NADL de *BVDV* que se inoculó en las mismas condiciones que las muestras. Las muestras se incubaron por 3-5 días en una estufa con 5% CO₂. Los cultivos fueron monitoreados diariamente para la observación de cambios celulares. Después del periodo de incubación (promedio de 72 a 96 horas), se obtuvo el sobrenadante y se conservó a -70°C para pruebas posteriores. La monocapa celular se utilizó para realizar la prueba de inmunoperoxidasa para ambos biotipos de *BVDV*.

3.2.3 Inmunodetección y confirmación de cepas no citopáticas de *BVDV* a través de inmunoperoxidasa

Después del periodo de incubación y la observación de los cultivos, se fijó la monocapa celular con una solución de 2% de paraformaldehído en PBS por 1 hora a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se eliminó el fijador y se lavaron las placas 3 veces con 200 μ l de PBS. Enseguida se permeabilizaron las células con 2% de Triton-100® en PBS por 15 min. a TA. Como anticuerpo anti-*BVDV* se utilizó el sobrenadante del hibridoma Code7 contra la proteína NS3 conservada en miembros del género *Pestivirus* a una cantidad de 50 μ l por pozo y se incubaron por 2 h. en la estufa de CO₂. Para marcar los anticuerpos se utilizó 40 μ l de proteína G-peroxidasa según las instrucciones del estuche comercial (Inmunoperoxidasa Bive Kits, Productora Nacional de Biológicos Veterinarios®) en un Buffer de 3% BSA (albumina sérica bovina) en PBS, las placas se incubaron por 1 h a TA. Después de 3 lavados con PBS se agregó 100 μ l de sustrato (Fosfato de sodio 0.5 M, ácido cítrico 0.1 M, 3-amino-9etil-carbazol como indicador y peróxido de hidrógeno al 30%) incubándose por 15 minutos a TA. La reacción de coloración se detuvo con un lavado con PBS entre 5 a 15 min dependiendo del grado de coloración alcanzado (Harlow, 1999).

Después de este proceso se observaron las monocapas celulares al microscopio invertido con el objetivo 20X, tanto de las muestras inoculadas como los controles. Una coloración rojiza del citoplasma alrededor del núcleo fue tomada como reacción positiva a la peroxidasa.

3.2.4 Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de *BVDV 1 - 2*

3.2.4.1 Extracción de ARN

La extracción del ARN, a partir de todos los sobrenadantes y células de las muestras procesadas, se realizó mediante la técnica de Trizol-Reagent® (RNA/DNA/PROTEIN ISOLATION REAGENT de Invitrogen).

La extracción de ARN se realizó a partir del sobrenadante y las células obtenidas a partir del aislamiento viral, generalmente una homogenización de sobrenadante y células después de una congelación y descongelación. Se colocó 100 µl de muestra en un tubo, se agregó 1ml de reactivo TRIzol® Reagent utilizando un agitador para la homogeneización de la muestra, incubándose por 10 minutos a TA. Una vez terminado el periodo de incubación añadieron 0.2 µl cloroformo por cada ml de trizol utilizado, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a TA por 2 a 3 min. Posteriormente se centrifugó la muestra a 12.000 rpm 15 minutos a 4° C, el homogeneizado en este paso se separó en una capa superior clara acuosa (que contiene ARN), una interface, y una capa inferior roja orgánica (que contiene el ADN y las proteínas). Cuidadosamente se recolectó con una micropipeta la fase acuosa (cerca del 60%) y se transfirió a un tubo nuevo.

Para la precipitación del ARN a partir de la fase acuosa se agregaron a la misma 0.5 ml de alcohol isopropílico (cuando se ha usado 1 ml de TRIzol® Reagent para el homogeneizado inicial) se incubó por un periodo de 10 min a TA para formar un pellet a partir del ARN precipitado, se centrifugó la muestra a 12000 rpm por 10 min a 4° C lo que formó un pellet visible blanquecino en el fondo del tubo. Una vez identificado el pellet el alcohol se elimina (teniendo cuidado de no desprender el pellet), así mismo o

enseguida se agrega 1 ml de etanol 75%, se mezcló mediante “vortex” y se centrifuga 8000 rpm por 5 min a 4° C, al final de este procedimiento se retiró el alcohol al 75% y se dejó secar el pellet a TA, el pellet ya seco fue resuspendido en 25 – 50 µl de agua para PCR libre de RNasas. El ARN se conservó a -20° C para posteriores aplicaciones como es en el caso de RT-PCR.

3.2.4.2 RT-PCR

El RT-PCR se realizó en un solo paso con ayuda del estuche comercial “SuperScript® III One-Step RT-PCR 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”.

Los oligonucleótidos empleados para esta técnica son el OL 100 (5'-CAT GCC CWY AGT AGG ACT AGC-3') y el OL 380R (5'-AAC TCC ATG TGC CAT GTA GAG-3'), situados dentro de la región 5'NTR altamente conservadas dentro del género *Pestivirus* (Becher et al., 1998a). En cada corrida se incluyó como control positivo a la cepa NADL del *BVDV-1* y como control de contaminación, agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato). Los ciclos de amplificación de la reacción fueron los siguientes: desnaturalización inicial de la muestra a 94°C-3 min; 4° C-30 seg; 1 ciclo de retrotranscripción de 50° C-30 min; 40 ciclos de PCR (94°C-30seg, 55°C-30seg, 72° C 30 seg); y una extensión final de 72° C-5 min. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.5% esperando un producto de amplificación de 299 pb para las muestras positivas a *Pestivirus* (Becher et al., 1998b, 1998a; Cedillo Rosales, 2005).

3.2.5 Comparación de la prueba diagnóstica de Aislamiento Viral, Inmunoperoxidasa indirecta y RT-PCR para BVDV

Se ha documentado que las pruebas moleculares como el RT-PCR comparada con la técnica de aislamiento viral e IPO son más sensibles. Por tal motivo se realizó un ensayo comparativo para determinar la sensibilidad de la IPO comparado con la RT-PCR y el aislamiento viral utilizando como control la cepa citopática NADL.

Para determinar la TCID₅₀/ml (dosis infectiva al 50% para el cultivo celular) de la cepa citopática del virus control NADL se realizó una titulación en placa de 96 pozos. Para realizar la titulación del NADL se corrieron 8 repeticiones, para lo cual se utilizó una dilución inicial de 1:100 para el sobrenadante que contenía el virus. Se colocaron 100 microlitros de medio en cada pozo de la placa. El factor de dilución con que se trabajaron los posteriores pozos fue de 3, es decir se realizó una primera dilución de 1:3 (dilución inicial 1:300) en la hilera 1 (A-H) de la placa (50µl de virus por 100µl de medio), la mezcla se homogenizó con 5 a 10 pipeteos en el pozo y se desecharon las puntillas, con nuevas puntillas se tomaron 50µl y se homogenizaron en el pozo correspondiente a la siguiente hilera y así repetidamente hasta la hilera 10 donde los 50µl serían desechados. Las hilera 11 y 12 fueron utilizadas como control celular (Fig.1). Finalmente se agregó a toda la placa 2.5×10^5 células MDBK en 100 µl de medio con 10% de SE.

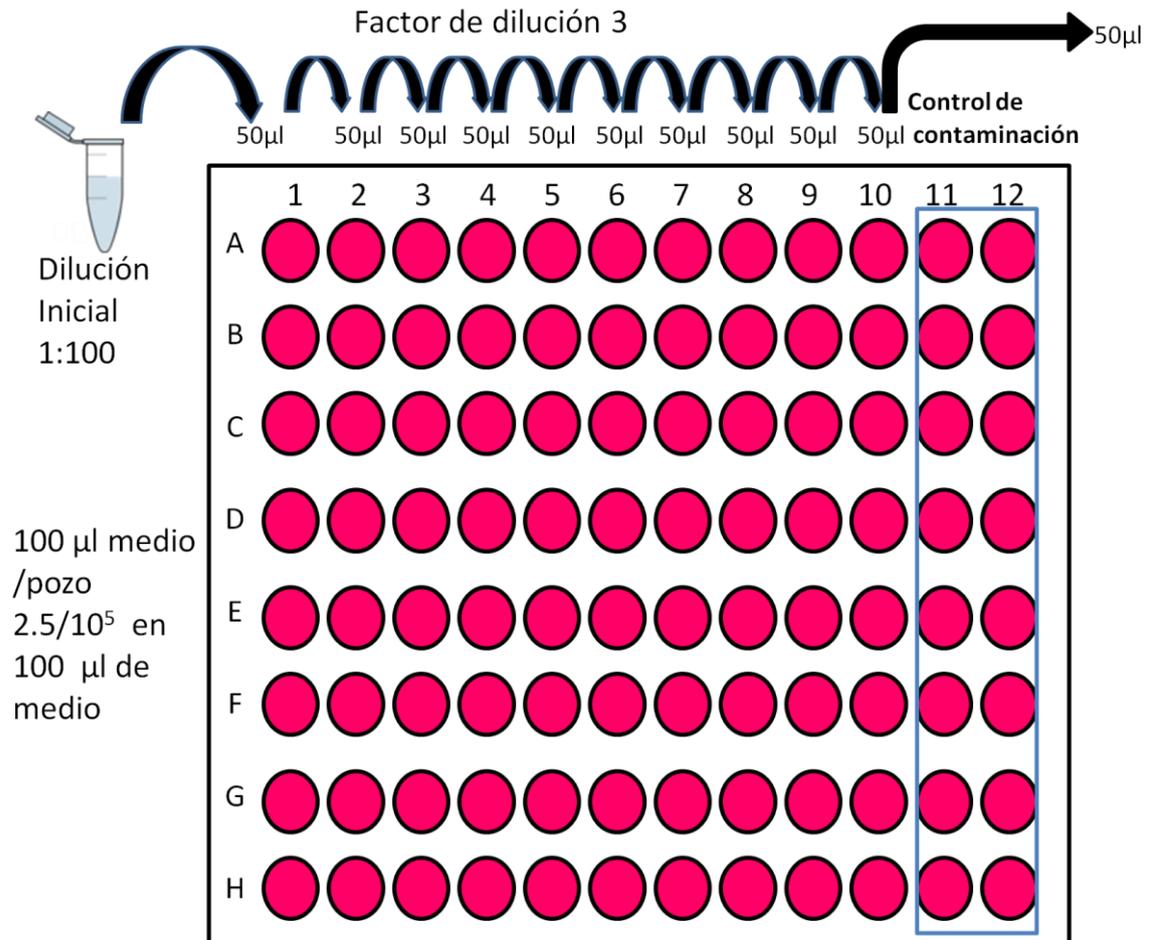


Fig. 1: Esquema de la placa de cultivo utilizada para determinar la titulación viral de la cepa control *BVDV-1*, NADL (TCID₅₀/ml). Se realizó un dilución inicial de 1:100 del stock viral en medio de cultivo, el cual se colocó en la primera hilera con 100µl de medio (1A-1H), posteriormente se realizaron subsiguientes diluciones en factor 3, hasta la hilera 10A-H. Las flechas indican diluciones hechas. El cuadro azul representa los pozos que se utilizaron como control negativo.

Las placas se incubaron en una estufa de CO₂ por 3-4 días observando diariamente si se presentaba efecto citopático. Después del periodo de incubación se determinó la máxima dilución en donde se presentó efecto citopático. Así mismo se determinó la TCID₅₀/ml utilizando el coeficiente de relación de Spearman-Kärber.

Se recolectó a partir de los pozos por cada hilera un pool de sobrenadante y se guardó a -70°C hasta su uso. Las células se fijaron con 2% PFA para llevar a cabo la IPO.

Los PCR se realizaron a partir de los grupos de dos diluciones menores y mayores a partir de la máxima dilución en que se observó efecto citopático como se indica arriba.

3.2.6 Muestreo en un lote de bovinos destinados a corral de engorda para la detección de *BVDV* mediante aislamiento e inmunoperoxidasa indirecta.

Se utilizaron para este estudio 5,390 muestras de sueros provenientes de centros de acopio de bovinos para corrales de engorda y para la exportación, los cuales fueron remitidos originalmente para la detección de anticuerpos contra *BVDV*, *BLV*, *BoHV-1*. Para la detección de anticuerpos, se aplicó la técnica ELISA indirecta, utilizando el kit comercial IDEXX BVDV Total Ab[®].

Estos sueros fueron proporcionados para analizar la presencia de viriones infectivos del *BVDV* mediante aislamiento viral y pruebas moleculares. Tomando en cuenta el número de muestras, para hacer un análisis del total de ellas, se realizaron grupos de 10 sueros. A partir de la muestra de suero conservada a -20°C se tomaron 100 µl una vez descongelada la muestra a temperatura ambiente y se alícuotó en microtubos de 1 ml junto a otras 9 muestras. Así mismo se registraron los datos de las muestras correspondientes a cada pool y se registraron en una bitácora de trabajo para poder rastrear las muestras en caso de que algún pool fuese positivo.

Para evitar que los sueros positivos a anticuerpos contra *BVDV* neutralizaran los posibles viriones presentes en sueros de animales infectados se realizaron pools por separado de animales serológicamente positivos y animales serológicamente negativos, realizándose el aislamiento viral finalmente a partir de 539 pools que fueron conservados a -20°C hasta su uso (Tabla 1).

Sueros positivos a ELISA	Sueros negativos a ELISA	Sueros sin analizar	Total de sueros analizados
3660	1702	28	5390
366 pools	170.2 pools	2.8 pools	539 pools

Tabla 1. Total de sueros analizados por la prueba de ELISA (detección de anticuerpos contra *BVDV*) y total de pools para someter a aislamiento viral.

4 RESULTADOS

4.1 Establecimiento del aislamiento viral para *BVDV*

Se estandarizó la técnica de cultivo y aislamiento viral utilizando de base el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (OIE, 2004). Se utilizó el protocolo indicado para el aislamiento de *BVDV* a partir de muestras clínicas, se incluyó como control positivo la cepa de *BVDV-1/ NADL*. La infección del virus se determinó por su efecto citopático (ECP) sobre las células de la monocapa (MDBK) usada como indicador de infección (Fig. 2). El sobrenadante de la monocapa infectada se utilizó para realizar una titulación viral, es decir, para determinar la dosis infectiva de cultivo celular al 50%/ml (TCID₅₀/ml).

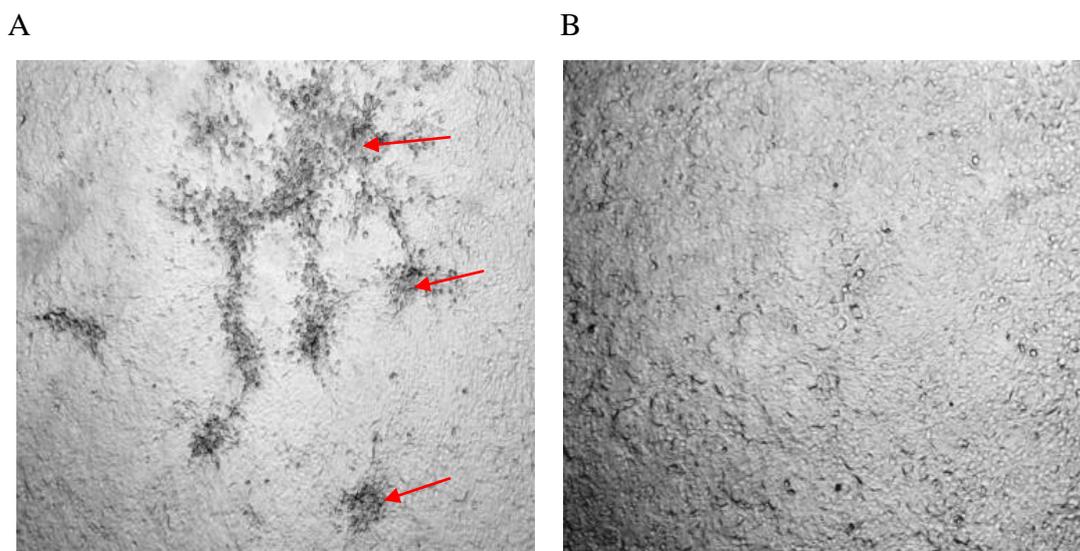


Fig. 2: Efecto citopático de la cepa control de *BVDV-1*, NADL así como control negativo de infectividad en una monocapa celular. A. Se muestra una monocapa de células (MDBK) con efecto citopático (CPE) causado por la infección con NADL (flechas). **B.** Monocapa de células control negativo de infectividad donde no se observa efecto citopático.

4.2 Estandarización de la inmunoperoxidasa indirecta para la detección de *BVDV*

Para llevar a cabo la estandarización de la IPO para *BVDV* se colocaron en placas de 96 pozos células MDBK (2.5×10^5 células por pozo) y se infectaron con 100 TCID₅₀, dando como resultado la aparición de CPE en la monocapa celular después de 3 días. Se recogió y eliminó el sobrenadante, las monocapas celulares se fijaron con paraformaldehído al 2% y se permeabilizaron con triton-100 al 2%. En este caso como anticuerpo anti-*BVDV* se utilizó un monoclonal CODE 7 dirigido contra la proteína NS3 que se une a una región conservada de esta proteína en todos los *Pestivirus* (Dubovi, 1990). Como método de detección para estos anticuerpos se utilizó una proteína G que se une a la región FC del anticuerpo anti-*BVDV*, y después de agregar el sustrato AB y el indicador nos dio como resultado positivo una coloración o un precipitado café rojizo en el citoplasma de las células infectadas. Al ser NADL una cepa citopática se pudo observar claramente la tinción rojiza en las placas citopáticas como se muestra en la Fig. 3.

Mediante esta técnica se confirmó que todos los pozos que presentaron efecto citopático presentaron también una coloración café rojiza, como resultado de la IPO en las placas CPE y una falta de coloración en las células que no presentaban este efecto. Así mismo los controles negativos (donde no se inoculó el virus) además de no presentar efecto citopático no presentaron coloración alguna (Fig. 3). Esto comprueba que tanto el anticuerpo como la técnica detectan en forma específica las proteínas del virus *BVDV* (Becher et al., 2003).

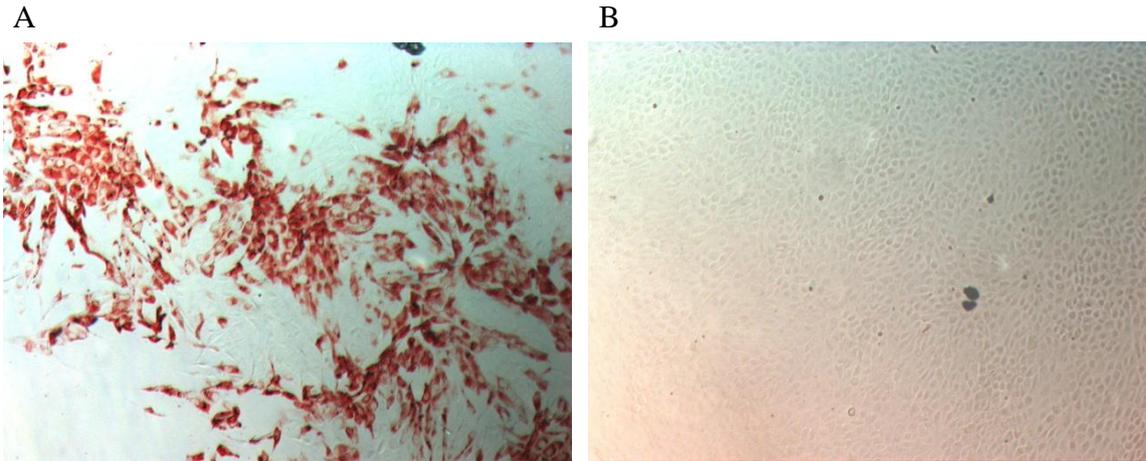


Fig. 3: Tinción de inmunoperoxidasa indirecta para *BVDV-1*, NADL y control negativo. Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína NS3 de los *Pestivirus*, usando una proteína G marcada con PO y sustrato de la misma para revelar la presencia de complejo Ac-NS3. **A.** Monocapa celular (MDBK) infectada con NADL, se puede observar una tinción intracitoplasmática rojiza específica, donde las células no infectadas carecen de coloración y esto está acorde al efecto citopático presente en el cultivo. **B.** Cultivo celular (muestra control) no infectado con *BVDV*, pero procesada para la IPOI, se observa la monocapa celular sin CPE y sin tinción intracelular.

4.3 Resultados RT-PCR para *BVDV*

El par de iniciadores utilizados para el RT-PCR fueron tomados de la literatura (Becher et al., 1998b, 1998a; Cedillo Rosales, 2005).

Los que amplifican un segmento de la región 5'UTR de la base 107 a la base 393 de miembros del género *Pestivirus*, incluidas las especies *BVDV-1* y 2. (Tomando como base la secuencia de NADL, número de acceso al Genbank NC_001461). El producto de amplificación del virus control fue de 286 pb, que puede variar hasta 299 según distintas cepas del género *Pestivirus*. (Fig. 4).

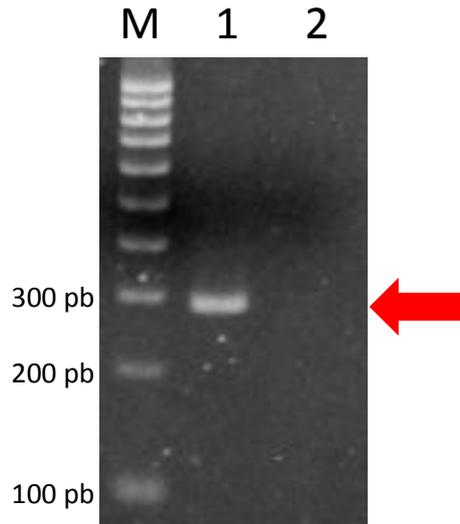


Fig.4: Electroforesis del producto de RT-PCR para *Pestivirus*. Se amplificó un fragmento genómico del segmento 5'UTR de la cepa NADL-1 de *BVDV*. Carril **M**. marcador de peso molecular; Carril **1**. Fragmento de 286 pb del Control positivo, cepa NADL (flecha roja). Carril **2**. Control Negativo de amplificación.

4.4 Resultados de la prueba comparativa del aislamiento viral,

Inmunoperoxidasa indirecta y RT-PCR para *BVDV*

Utilizando como control positivo a la cepa citopática NADL (*BVDV-1a*) se realizó una titulación viral que nos permitió por un lado determinar el TCID₅₀/ml de esta cepa, así mismo nos permitió obtener tanto el sobrenadante con partículas virales además de las monocapas infectadas para realizar a partir de estos RT-PCR y IPO respectivamente. La titulación viral se realizó en base a la observación de las placas citopáticas presentes en el cultivo celular después de 3 días de incubación de la monocapa con el sobrenadante. Para esta titulación como se describe en materiales y métodos se utilizó una triple diluciones con 8 repeticiones, dando como resultado la presencia de placas citopáticas hasta la dilución 1:72900 basados en estos datos se determinó el TCID₅₀/ml utilizando el coeficiente de relación de Spearman-Kärber, dándonos una titulación de 1.69×10^6 TCID₅₀/ml. Además de *Pestivirus* existen otros virus que pueden causar el mismo efecto citopático en cultivo celular (ejemplos: *BoHV-1*) y que es indistinguible en base a la observación del mismo se debe realizar pruebas confirmatorias para

establecer que este efecto es producido por *BVDV*. Estas pruebas confirmatorias incluyen inmunodetección de proteína viral mediante inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa directa e indirecta utilizando anticuerpos poli o monoclonales específicos para *Pestivirus* o *BVDV*, así como las técnicas que detectan genoma como el RT-PCR o inclusive Northern blot. En este caso, como se describe arriba, se establecieron dos pruebas confirmatorias, la IPO y el RT-PCR. En base al control positivo se estableció que todas las repeticiones que se observaron efectos citopático fueron positivas por ambas técnicas respectivamente. Sin embargo se quiso comprobar que en las diluciones superiores a donde no se observó el efecto citopático realmente fuesen negativas al virus, por lo que esta comparación se realizó haciendo una placa de titulación viral en base al efecto citopático, así mismo haciendo RT-PCR a partir de tres diluciones antes y después (dilución de la 3^4 - 3^{10}) de donde se observó la última dilución con placas citopáticas (3^7) (Fig. 5). Esto nos permitió establecer que la RT-PCR detectó hasta la dilución 3^8 genoma viral que corresponde al 5.72×10^6 TCID₅₀/ml (Fig. 5 y 6).

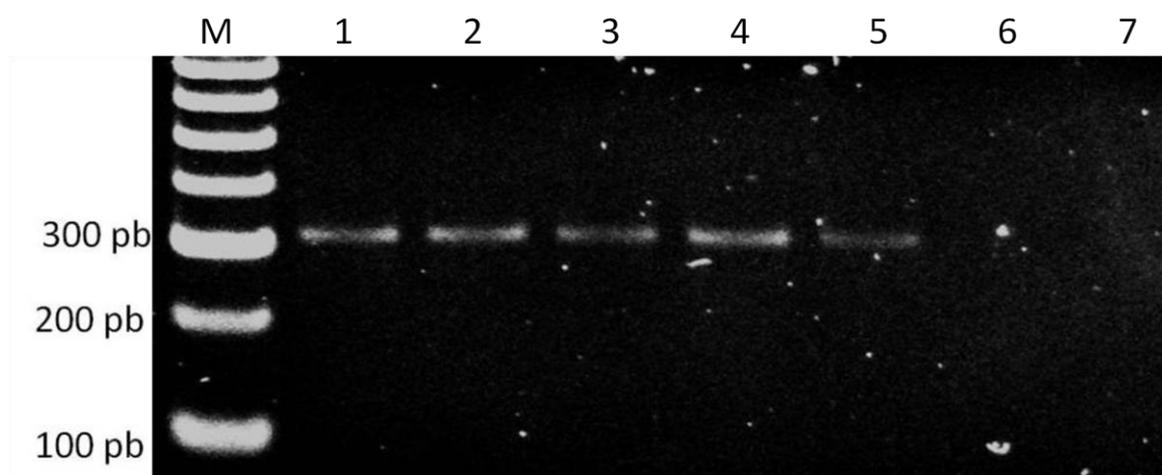


Fig.5: Electroforesis de los amplicones por RT-PCR para *BVDV*-NADL usado como prueba confirmatoria en la titulación del virus. Se amplificó un fragmento genómico del segmento 5'UTR de la cepa NADL-1 de *BVDV* a partir de sobrenadantes de la dilución viral 3^4 - 3^{10} . Carril M. marcador de peso molecular; Carriles 1-5. Fragmento de 286pb amplificado de NADL a partir del sobrenadante de las diluciones 3^4 - 3^8 respectivamente. Carriles 6-7. Dilución viral negativa 3^9 - 3^{10} .

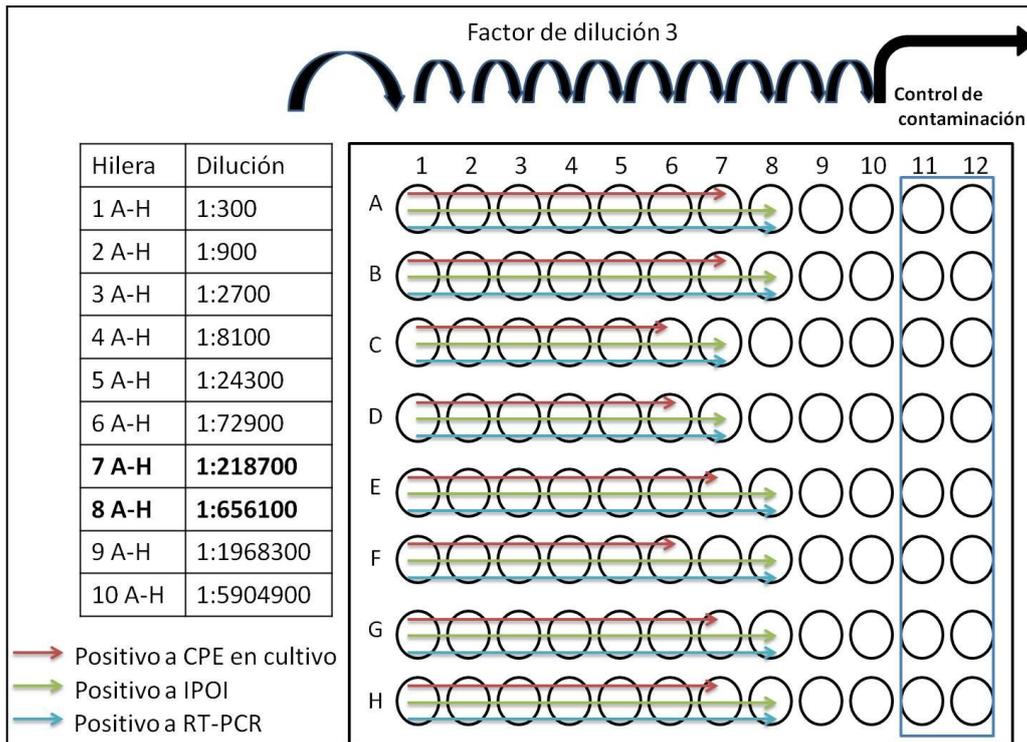


Fig. 6: Resultados de la comparación de las técnicas en base a el cálculo de TCID₅₀/ml del virus citopático NADL. En base a la titulación realizada en esta prueba se calculó la TCID₅₀/ml del virus NADL usando en primer lugar la visualización del efecto citopático del mismo en cultivo celular (flecha roja), así mismo se determinó mediante IPOI la titulación a la cual se observó tinción específica en la monocapa celular y se muestra con las flechas verdes. Por último se muestra en flechas azules la titulación determinada mediante la RT-PCR a partir del sobrenadante de esta placa de titulación. El recuadro azul muestra los pozos utilizados como controles negativos. El recuadro de la izquierda indica las diluciones realizadas en este experimento y resalta en color negro las diluciones que presentaron la titulación mayor en cada prueba.

Para llevar a cabo la IPO se utilizaron las monocapas celulares de la titulación viral como se indica en materiales y métodos. En este caso la IPO se llevó a cabo en toda la placa dando como resultado una tinción citoplasmática en las células presentes en las placas citopáticas y observándose una falta de coloración en células que no presentaron efecto citopático. Sin embargo mediante esta técnica se pudo apreciar una coloración rojiza en el citoplasma de las células presentes en los pozos de una dilución más alta donde se presentaron las placas citopáticas (3^8) que corresponde a una titulación de 5.72×10^6 TCID₅₀/ml (Fig. 6 y 7). Lo anterior concuerda con los resultados observados mediante el RT-PCR (Fig. 5 y 6).

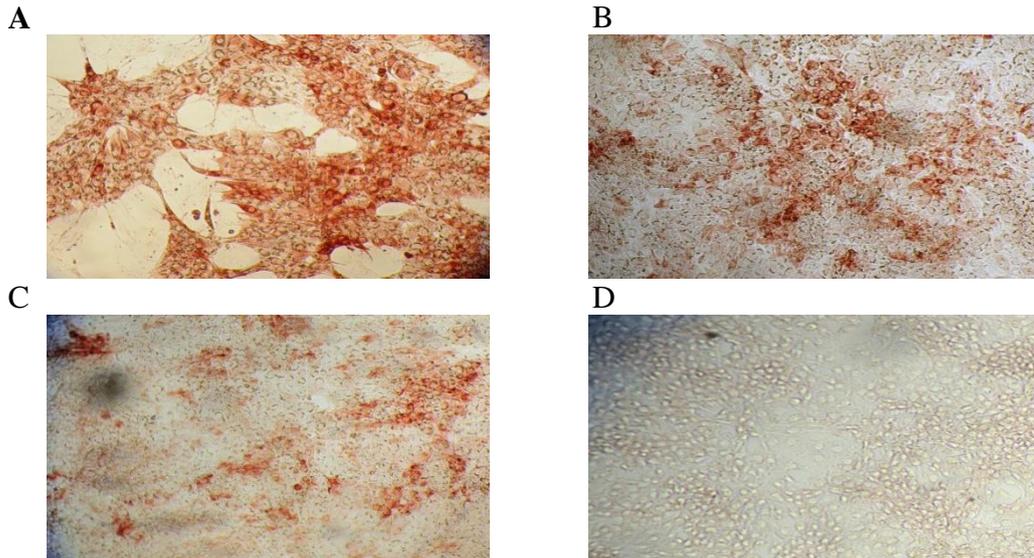


Fig. 7. Tinción de Inmunoperoxidasa para la titulación viral de la cepa NADL. A. Dilución inicial del virus 1:300 (3^1), obsérvese la tinción café rojiza dentro del citoplasma celular alrededor del núcleo y un amplio efecto citopático en la monocapa celular. **B.** Dilución viral 3^4 con presencia clara de tinción rojiza intracitoplasmática se observa menor daño en la monocapa celular y el CPE mas localizado. **C.** Dilución viral 3^8 coloración rojiza en áreas con efecto citopático en la monocapa celular, se observan además un alto número de células sin infectar. **D.** Dilución viral 3^9 , monocapa celular negativa a la presencia de efecto citopático y tinción por inmunoperoxidasa.

A través de esta comparativa de las tres técnicas con un control conocido por lo menos en este ensayo se pudo determinar que la RT-PCR y la IPO permiten detectar el virus a una dilución mínima que si bien infecta las células no es la cantidad suficiente para provocar un efecto visual como lo es el efecto citopático en la monocapa celular en el período de incubación en que se llevó a cabo el ensayo (periodo de tiempo recomendado por la OIE).

4.5 Resultados del muestreo en un lote de bovinos destinados a corral de engorda.

Una vez comprobada la estandarización del aislamiento viral, IPO indirecta y RT-PCR se procedió a trabajar con 5390 sueros de bovinos provenientes de centros de acopio destinados a la engorda, en los que no se pudo establecer el lugar de origen, calendario de vacunación, raza, sexo.

Los sueros fueron inicialmente analizados por ELISA indirecta (Kit para la detección de Anticuerpos frente a BVDV de IDEXX® BVDV Total ab™) para determinar el estatus serológico de los bovinos con respecto a BVDV. Del total de las muestras analizadas, 3660 (68%) de sueros presentaron anticuerpos, así como un total de 1702 sueros (32%) resultaron ser negativos (Tabla 1). Por falta de información de las muestras (procedencia, sexo, edad, estatus sanitario) no se pudieron analizar estos resultados para poder determinar una seroprevalencia verdadera de la población de la cual provienen los animales. Sin embargo la finalidad de este estudio fue comprobar que en este lote de animales no se presentaron infecciones agudas o persistentes por *Pestivirus*. Por lo cual los datos de la serología fueron muy importantes para realizar los pools de muestras que se llevarían a cultivo. Es decir fue determinante que las muestras que fueron positivas a anticuerpos no se mezclaran con las muestras negativas a los mismos, ya que estos anticuerpos en caso de existir viriones en estos sueros podrían neutralizar la infección. Tomando en cuenta esto, del total de 5390 muestras se realizaron 539 pools (10 muestras por pool) que fueron utilizados para realizar aislamiento viral y como técnica comprobatoria específica se utilizó la Inmunodetección por Peroxidasa en todas las muestras y RT-PCR.

Los 539 pools se inocularon en células MDBK en placas de 96 pozos y se observaron cada 24 h para detectar el CPE dándole una incubación máxima de 4 días. En uno de los pozos se presentó contaminación bacteriana por lo que el sobrenadante del pozo fue filtrado, sembrándolo nuevamente. Al término del período de incubación no se observó efecto CPE característico del virus en ninguna de las muestras, por lo que se descartó el aislamiento de una cepa citopática. Sin embargo para descartar la presencia de cepas BVDV Ncp las cuales no causan un efecto visible en la monocapa celular al momento de su replicación, se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa

indirecta en todos los pozos, utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra una región conservada en todos los *Pestivirus* de NS3, esto nos permitió descartar la presencia de virus Ncp en las monocapas celulares.

De los 539 pools a la tinción con IPO indirecta en 54 pools las monocapas celulares presentaron una tinción a IPO (tinción de membrana) pero no específica o característica del *Pestivirus* (tinción en retículo endoplásmico). Estas muestras se tomaron como sospechosas por lo que se tomó la decisión de hacerles un segundo y tercer pasaje celular para replicar el virus para comprobar la negatividad de las mismas, haciendo una IPO indirecta después de cada pasaje en todas las monocapas celulares y utilizando el sobrenadante para hacer el siguiente pasaje. Como resultado de estos pasajes no se observaron ECP en ninguno de los siguientes pasajes, así mismo no se presentó una coloración específica en retículo endoplásmico mediante la técnica de IPO.

Del tercer pasaje de las muestras sospechosas se realizó un RT-PCR a partir de 12 pools que se hicieron de estas 54 muestras separados positivos a anticuerpos contra *BVDV* por ELISA indirecta de negativos a anticuerpos de *BVDV* (6 muestras/pool positivos y 6 muestras/pool negativos). En este ensayo se evidenció la amplificación de los controles positivos con la cepa NADL al nivel de las 299 pb, lo que concuerda con la amplificación de los *Pestivirus*. Se puede ver como el resto de las muestras o pools no amplificaron, lo que estaría nuevamente indicando que no se encuentra el virus en los sueros estudiados.

5 DISCUSIÓN

El mercado mundial de animales y productos derivados obliga al establecimiento de normas comunes para asegurar la calidad de los productos y las garantías sanitarias para los animales y personas. El control de determinadas enfermedades de origen infeccioso, especialmente aquellas con carácter zoonótico, se convierte en un objetivo prioritario, no sólo por las pérdidas económicas directas, sino también por las limitaciones que pueden suponer para el comercio internacional de animales o productos de origen animal (Gómez-Pacheco, 2009). La *BVDV* no es una enfermedad de carácter zoonótico, sin embargo, es una enfermedad que origina pérdidas económicas difícilmente cuantificables; las campañas de prevención y control implementadas en distintos países de diferentes continentes han permitido un control efectivo de la enfermedad e inclusive la erradicación evitando limitaciones de productos comerciales de origen bovinos de países libres del virus y una difícil comercialización de estos productos provenientes de países donde no existen medidas de prevención o control para *BVDV* (Avalos Ramirez 2012).

Una característica singular de esta enfermedad es la infección de los fetos dando lugar al nacimiento de animales persistentemente infectados (PI), que actúan como reservorios de la infección y son los principales diseminadores de la enfermedad dentro y entre granjas (Bolin, 1995). Por estas razones los animales PI tienen un importantísimo papel en la epidemiología de la enfermedad, porque intervienen en el mantenimiento del virus en una determinada zona, siendo por tanto su detección de especial interés en los programas de control de la enfermedad (Hilbe et al., 2007).

Por la razón anteriormente expuesta dentro de los objetivos marcados en este estudio, se estableció la detección de los animales persistentemente infectados (PI), aplicando para ello el aislamiento viral y pruebas confirmatorias como la Inmunoperoxidasa indirecta y la Reacción en Cadena de la Polimerasa, considerados los animales PI como principales reservorios y fuentes de infección dentro y entre explotaciones (Houe, 1999).

Los animales PI suelen ser seronegativos cuando se someten a técnicas de detección de anticuerpos (Brock and Chase, 2000) y tienen una gran probabilidad de sucumbir por otros procesos a lo largo de su vida, por lo que se estima que en poblaciones con una alta prevalencia de *BVDV* se encontrará una proporción de animales PI cerca del 2% e inclusive menor (Brock and Chase, 2000; Domínguez, 2009).

Cuando existen altas tasas de seropositividad en poblaciones no vacunadas es sugerente también de la existencia de animales PI en una explotación (Brock and Chase, 2000; Domínguez, 2009).

La precisión del diagnóstico para establecer el estatus sanitario de un animal con respecto a *BVDV* en hatos o grupos de bovinos dependerá por un lado directamente de la prueba diagnóstica empleada (tipo de prueba diagnóstica: aislamiento viral; ELISA, Inmunodetección, pruebas moleculares), así como la especificidad y sensibilidad de la misma), además del estatus sanitario y programas de control (calendario de vacunaciones y medidas de bioseguridad) que se tienen en el hato o grupo de bovinos con respecto a la infección o circulación de cepas de *BVDV*, así como el tipo de

infección que se presenta en el animal (infección aguda o persistente) (Houe et al., 2006). En base a la combinación de las variantes antes mencionadas se debe seleccionar la prueba diagnóstica más adecuada para cada grupo o hato bovino para realizar el diagnóstico más preciso de infecciones por *BVDV*.

Uno de los objetivos primordiales de este estudio fue establecer un sistema diagnóstico con una alta sensibilidad y especificidad que nos permitiera identificar animales persistentemente infectados o con infecciones agudas, partiendo de la premisa de disminuir la posibilidad de insertar en corrales de engorda animales PI que aumentarán las pérdidas económicas con la presentación de las formas clínicas de tipo respiratorio y digestivo ocasionadas por *BVDV* y otros microorganismos asociados a este. Por otro lado la exportación de bovinos tanto a Estados Unidos de Norteamérica como a otros países de este y otros continentes, se realizan teniendo un estricto control sanitario de enfermedades que ocasionan pérdidas económicas importantes, entre ellas *BVDV*, por lo que exigen certificados sanitarios que garanticen que los bovinos estén libres de estas enfermedades. Es importante contar con sistemas diagnósticos que nos permitan analizar el estado sanitario de estos animales con una sensibilidad y especificidad tal que evite la presencia de falsos negativos. El sistema diagnóstico implementado para esta investigación fue el aislamiento viral a partir de pools de muestras provenientes de bovinos que estaban dirigidos a la exportación o corral de engorda.

El aislamiento del virus es el método clásico y sigue siendo la prueba de oro para el diagnóstico del *BVDV*, este método requiere una experiencia técnica, equipo y material altamente sofisticado, además de tiempo (hasta 7 días) (Houe et al., 2006).. Sin

embargo sigue siendo el método más sensible y preciso para el diagnóstico de *BVDV* y en muchos países tienen como requisito para la importación de bovinos que lleven certificados con resultados negativos del aislamiento de este virus para otorgar los permisos. Así mismo la detección de animales PI a través de este método es un punto crucial en las campañas de control y erradicación del *BVDV* y de un gran interés para nuestro estudio (Houe et al., 2006).

Recordando que el *BVDV* puede presentar dos biotipos (citopático y no citopático) y tomando en cuenta que las lesiones citopáticas del virus no son exclusivas del virus, se debe combinar la técnica de aislamiento con una prueba confirmatoria que sea altamente sensible y específica para *BVDV*. Cumpliendo otro de nuestros objetivos se estableció la técnica de inmunoperoxidasa indirecta a partir de monocapas celulares donde se realizó el aislamiento viral como prueba confirmatoria, para la cual se utilizó un anticuerpo monoclonal contra NS3, una proteína altamente conservada en todos los *Pestivirus*, lo que garantiza la especificidad de la técnica, la cual ha sido comprobada en múltiples estudios con distinta cepas virales (Cedillo, 2004; Duvobi, 1999). Por otro lado la sensibilidad de la misma fue comparada en un estudio de titulación viral con la cepa control del virus citopático *BVDV-I/NADL* en cultivo celular a partir de la identificación de placas citopáticas en la monocapa celular. En éste estudio se determinó que la Inmunoperoxidasa indirecta tienen una sensibilidad igual o mayor (una dilución más) para detectar la infección en cultivo celular comparado con la detección visual de placas citopáticas presentes en la monocapa celular. Sin embargo, en seroneutralización viral cuando se establecen los 100 TCID₅₀ del virus para neutralizar se aceptan un límite de una titulación hacia arriba y una hacia abajo (30-421 TCID₅₀) siendo no significativa para el resultado de la prueba. Esto hace a la IPOI una prueba altamente sensible para la

detección de cepas no citopáticas de *BVDV* y nos excluiría la posibilidad de falsos negativos en las muestras procesadas.

Un tercer objetivo de este estudio fue comprobar los resultados arrojados por el aislamiento y la IPOI mediante el uso de un tercer método, la RT-PCR, uno de los métodos igualmente sensibles y específicos que recomienda la OIE para el diagnóstico de *BVDV*. La especificidad de la técnica se basa en el diseño de los iniciadores en regiones altamente conservadas por lo que en este estudio se utilizaron para amplificar un segmento conservado en los *Pestivirus* en la región 5'UTR probada con más de 30 cepas virales de las distintas especies de este género (Cedillo, 2004, Becher, 1999). Se ha determinado que la RT-PCR es uno de los métodos más sensibles incluso para la detección de animales PI a partir de células somáticas en tanques de leche de hatos con 100 o más animales. Según Hilbe, el RT-PCR se ha convertido en un método de diagnóstico de rutina y es altamente sensible así como específico, y tiene la ventaja la utilización de pools de muestras, que los anticuerpos específicos (vacunales o calostrales) no interfieren en los resultados de esta técnica (Fulton et al., 2009a) comparados con pruebas de aislamiento y seroneutralización (Sandvik, 2004; Hilbe et al., 2007). Haciendo una comparación de los resultados obtenidos por las técnicas de aislamiento viral (titulación viral en base a TCID₅₀/ml de la cepa citopática control *BVDV-1/NADL*), inmunoperoxidasa indirecta y RT-PCR, se determinó que la titulación obtenida por éstos últimos dos métodos fue idéntica, es decir se estableció el título en 5.72×10^6 TCID₅₀/ml comparado con el título erogado por la visualización del CPE de 1.69×10^6 TCID₅₀/ml. Estas técnicas, junto con la ELISA de captura de antígeno, IHQ han sido utilizadas en distintos estudios para la detección de PI a partir de suero, capa leucocitaria, secreciones nasales, muestras de tejido a partir de muescas de oreja. Dando

los mejores resultados las pruebas de IHQ y RT-PCR (Edmondson et al., 2007; Fulton et al., 2009a). Así mismo, a través de estos estudios se ha determinado que las pruebas más sensibles para detectar partículas virales de *BVDV* a partir de muestras de suero han sido las técnicas combinadas de aislamiento en cultivo celular y RT-PCR (Edmondson et al., 2007; Fulton et al., 2009a). En nuestro estudio tanto la IPO como RT-PCR después de un aislamiento en cultivo celular, resultaron con la misma sensibilidad utilizando nuestro virus control, lo que corresponde con los resultados de otros autores. Por lo tanto, la elección de cuál es la prueba que se debe utilizar o de que laboratorio no dependerán de su exactitud si no de otros criterios como el costo, la facilidad o conveniencia de la manipulación de muestras, y la simplicidad del método de ensayo (Zimmer et al., 2004; Hilbe et al., 2007).

Para este estudio se utilizaron muestras de sueros provenientes de animales clínicamente sanos, cuyo objetivo zootécnico sería la engorda o la exportación. Todos estos animales provenientes del centro y sur del país de los cuales no se sabe su ubicación específica. Se realizó en estos animales un tamizaje inicial para la detección de anticuerpos cuyo objetivo era determinar el estatus serológico frente a *BVDV* ya que para este lote en específico el permiso de importación del país de destino requería que los animales presentaran anticuerpos contra *BVDV*. En este caso no se determinó si los anticuerpos presentes fueron generados a partir de un calendario de vacunación o de infecciones agudas. Varios estudios realizados en México demuestran la presencia de seroconversión contra *BVDV* en distintos estados de la República Mexicana, donde no existe un sistema de vacunación, lo que demuestra la circulación del virus en hatos bovinos del país (Solis-Calderon et al., 2005; Domínguez, 2009; Segura-Correa et al., 2010). Sin embargo existen hatos donde se utilizan vacunas como medida de control

para estas infecciones virales (Domínguez, 2009). Se ha demostrado que altos niveles de anticuerpos vacunales o adquiridos a través del calostro en los becerros virémicos pueden enmascarar viremia persistente y disminuir la carga viral en infecciones agudas en el suero resultando falsos negativos para el aislamiento del virus así como en el ELISA de antígeno (Hilbe et al., 2007; Fulton et al., 2009a). Por lo antes mencionado y conociendo el ciclo de replicación del virus se decidió realizar la separación de muestras seropositivas de seronegativas, de tal forma que los anticuerpos de estas muestras positivas no neutralizaran posibles partículas virales presentes en otras muestras. La seropositividad obtenida mediante el análisis de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos en este estudio fue de 68%, lo que puede significar anticuerpos por infección del *BVDV*, inclusive en animales menores de 6 meses de tipo calostrado o por la aplicación de vacunas, lo que puede generar una respuesta inmune igual que la infección de campo (Beer et al., 2000; Brock and Chase, 2000). Por lo que uno de los principales problemas encontrados a la hora de interpretar los resultados, es la ausencia de información acerca del tipo de vacuna aplicada, y la determinación exacta de la edad de los animales para descartar anticuerpos calostrales ya que como se indicó anteriormente, con la técnica de diagnóstico utilizada no se puede diferenciar animales infectados naturalmente de aquellos vacunados o con anticuerpos provenientes del calostro (Deregt and Loewen, 1995; Lindberg, 2003). Deregt, afirma que el empleo de la seroprevalencia como indicador de la difusión de la infección por *BVDV* es bastante discutible y sólo sería un dato útil en zonas donde no se haya utilizado la vacunación (Deregt and Loewen, 1995; Lindberg, 2003). Por tanto, no podemos predecir la influencia que han podido tener las infecciones agudas en el alto porcentaje de anticuerpos contra *BVDV* detectados por ELISA.

Para seleccionar el número adecuado de muestras que se utilizaron para realizar los pools se realizó una revisión exhaustiva de metodologías donde se llevaron a cabo estudios similares, donde se reportaba que el número de muestras por pool dependía del porcentaje de prevalencia de animales PI en la población y de la sensibilidad de la prueba (Muñoz-Zanzi et al., 2000). Para *BVDV* se asume una prevalencia de entre 0.5 hasta un 2% (Houe, 1999) de animales PI en la población mundial de bovinos. En otros estudios con una prevalencia de 2% de animales PI y una sensibilidad de 100% de la prueba (aislamiento viral comparada con PCR) se estimó que el número de muestras por pool inicial fuese de 20 (Muñoz-Zanzi et al., 2000). En México no existen reportes de la prevalencia verdadera de PI, se ha reportado solamente seroprevalencia muy variada frente al *BVDV* (14% hasta 65%) (Solis-Calderon et al., 2005; Domínguez, 2009; Segura-Correa et al., 2010). Por lo que se tomó como prevalencia de animales PI el 2% reportado a nivel mundial, así mismo se tomó en cuenta que el cultivo celular reporta una sensibilidad del 100%, y basándonos en estos datos se determinó hacer pools iniciales de 10 muestras cada uno que nos permitiera trabajar un total de 539 pools en cultivo celular disminuyendo la posibilidad de falsos negativos y nos podría facilitar posteriormente el trabajo de muestras individuales cuando uno de estos pool fueran positivos. Por otro lado tendríamos menor posibilidad de falsos negativos debido al factor dilución de las partículas virales.

Una vez determinada la cantidad de pools a trabajar se llevó a cabo el aislamiento viral en cultivo celular seguido de una segunda prueba confirmatoria como fue la IPO indirecta de acuerdo a los protocolos establecidos por la OIE para *BVDV*. En México no existen datos publicados de estudios realizados para detectar la presencia de animales PI por lo que este sería uno de los primeros estudios enfocados a la detección

de estos animales. Sin embargo tenemos que tomar en cuenta que los animales que se muestrearon eran animales seleccionados específicamente por su condición corporal y estado de salud aparentemente sano, lo que conlleva a una disminución de la posibilidad de encontrar animales PI en este lote de bovinos. La literatura describe en algunos casos bovinos con una condición corporal buena y aparente sanos que presentaron infecciones persistentes, incluidos algunos con infecciones localizadas en testículos y con anticuerpos contra *BVDV* (Flores et al., 2000; Niskanen et al., 2002). Por lo que en esta investigación no se descartó que los animales seropositivos fueran además persistentemente infectados (Flores et al., 2000; Niskanen et al., 2002). El riesgo de no detectar animales PI es de gran importancia, ya que estos animales arrojan grandes cantidades de virus y deben ser identificados con absoluta fiabilidad. La IPO, antígeno ELISA, y en RT-PCR son herramientas fiables para esta tarea. Cada método tiene una tasa de error de 0.77 a 1%, que resultó de fallo para detectar animales infectados de forma transitoria (1%) (Zimmer et al., 2004). Sin embargo, los animales infectados de forma transitoria no representan un riesgo importante para sus compañeros y no son de relevancia epidemiológica (Zimmer et al., 2004; Hilbe et al., 2007).

Los requisitos sanitarios marcados en distintos países contienen, además de hatos libres de brucelosis y tuberculosis, pruebas zoonositarias para la tricomoniasis bovina, leucosis bovina, IBR, lengua azul y BVD. Para esta última es vital la detección oportuna de animales PI que son los reservorios más importantes para el mantenimiento del virus en hatos bovinos (Lindberg and Alenius, 1999). Para esto último se tomó la decisión de procesar en este estudio el total de muestras provenientes del lote de bovinos.

En la literatura internacional existen diferentes puntos de vista sobre los factores que intervienen en la entrada y permanencia de estos agentes en las explotaciones, para lo cual se dice que el *BVDV* es un agente con una seroprevalencia de hasta 85% en bovinos bajo el sistema vaca cría y el principal factor de riesgo es la presencia de un animal que nace infectado con el virus y permanece persistentemente infectado (PI) el resto de su vida, la ocurrencia de estos animales se ha estimado hasta en un 2% (Houe, 1999; Thurmond et al., 2001; Domínguez, 2009). En programas de control y erradicación de *BVDV* las pruebas individuales deben asegurarse de que no hay animales PI trasladándose el virus a otros hatos (Houe et al., 2006).

Los resultados del tamizaje de un lote de 5390 animales para la detección de *BVDV* demostraron que en este lote no existieron animales con infecciones persistentes así como infecciones agudas, aplicando como prueba específica después del aislamiento viral la IPO. Para evitar el diagnóstico falso negativo debido a una baja cantidad de partículas virales en el suero se realizaron tres pasajes consecutivos de las muestras con tinciones inespecíficas en citoplasma para IPO. Así mismo después de cada pasaje además de la IPO se realizó un RT-PCR para detectar genoma viral a partir de estas muestras, confirmando la negatividad de estas muestras, por lo que asumimos que en este lote no se presentaron animales PI.

Diversos programas de control y erradicación enfocados en *BVDV* incluyen determinar el estatus sanitario del hato con respecto a *BVDV* a través de distintos procesos de diagnóstico según las condiciones de manejo de cada hato (Lindberg and Alenius, 1999). Por lo general en hatos bovinos tanto de leche como de carne cuando no existe la vacunación se realiza una detección primaria de anticuerpo, cuando los niveles

de anticuerpos son muy bajos se repite el diagnóstico serológico en todo los animales y si éste resultado resulta negativo el hato se considera libre de *BVDV* y tendrá que monitorearse con frecuencia y evitar la entrada de animales que hayan resultado positivos al virus. Para todos los hatos donde los resultados fueron niveles altos de anticuerpos en ausencia de vacunación se inicia un esquema de muestreo a partir de sangre o muestras de leche (hatos lecheros), para la detección de viriones o parte de su estructura, utilizando para ello un muestreo de todos los animales jóvenes, entre 6 y 9 meses, y vaquillas de primer parto. Cuando los resultados dan negativos el hato se puede tomar como libre de *BVDV* y se tendrá que monitorear para evitar la introducción de animales PI o de infecciones agudas (Lindberg et al., 2006). En el caso de que estos animales muestreados salieran positivos se tiene que realizar un muestreo extensivo en todo el hato para determinar animales con infecciones agudas, sobre todo animales PI y después establecer un sistema para ir eliminando estos animales aunado a un monitoreo constante de los mismos (Lindberg and Alenius, 1999). En otros programas de control pueden incluirse estrategias de vacunación en estos sistemas la vacunación está enfocada en prevención de producción de animales PI (Ridpath et al., 2003) junto con la eliminación de estos animales, además de un monitoreo constante en los becerros recién nacidos (Moennig et al., 2005). Aunque existen variaciones en los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por las vacunas de virus inactivado y virus vivo modificado, la vacunación disminuye el porcentaje de animales virémicos y la transmisión del *BVDV*, además de disminuir las pérdidas asociadas con la enfermedad (Hamers et al., 2000; Hamers et al., 2002). La determinación de los títulos de anticuerpos en el suero no es una medida adecuada de la eficiencia de las vacunas (Cortese et al., 1998; Ridpath et al., 2003). Según la experiencia del autor, las hembras vacunadas expuestas al *BVDV* durante la preñez temprana pueden producir becerros persistentemente infectados

(Ridpath et al., 2003). La eficiencia de la vacunación maternal en la protección fetal varía entre 25 y 100% para las vacunas inactivadas (Brownlie et al., 1995) y entre 58 y 88 % para las vacunas vivas modificadas (Brock and Chase, 2000). Aunque las vacunas no son 100 % efectivas, las vacas producen niveles significativos de anticuerpos contra el *BVDV* después de la vacunación. Sin embargo, una cantidad suficiente del virus escapa de la inactivación de los anticuerpos circulantes en algunas hembras y el virus puede causar infección transplacentaria, aborto y el desarrollo de una infección fetal persistente, por lo cual los programas de vacunación como única herramienta resultan inadecuados para el control del *BVDV* (Brock et al., 1998; Brock and Chase, 2000; Brock, 2004).

Los resultados generales de esta investigación nos permitieron establecer por un lado un sistema de diagnóstico suficientemente sensible y confiable para detectar animales PI por el *BVDV*, siendo estos uno de los principales pilares para el control y erradicación del *BVDV*. Por otro lado, nos sugieren que en México se inician programas de control a través de la utilización de vacunas en los hatos bovinos, sin embargo no se sabe con exactitud que sistemas de vacunación se utilizan. Así mismo es muy importante determinar la prevalencia e incidencia real de *BVDV* en el país y establecer programas de control para el mismo incluyendo además de la vacunación un sistema de bioseguridad en los hatos bovinos del país.

6 CONCLUSIÓN

Se logró establecer un sistema de diagnóstico para *BVDV* a partir de muestras clínicas de bovinos siguiendo la metodología sugerida por la OIE.

Siendo el aislamiento viral de *BVDV* en cultivos celulares la prueba de oro para este agente etiológico, se ha combinado con un ensayo de inmunodetección con peroxidasa para corroborar que el efecto citopático en las células haya sido ocasionado por el *BVDV* o miembros del género *Pestivirus* mediante el empleo de anticuerpos específicos para la proteína NS3 de los *Pestivirus*. Así mismo el empleo de esta técnica confirmatoria nos permitió detectar el biotipo citopático del *BVDV*, demostrando una sensibilidad equiparable a la prueba confirmatoria de RT-PCR después del aislamiento.

Este sistema diagnóstico nos ofrece la ventaja de poder analizar un alto número de muestras con una alta especificidad y sensibilidad en la detección de animales persistentemente infectados o con infecciones agudas por *BVDV*.

Este sistema de diagnóstico se utilizó para detectar la presencia de *BVDV* en un lote comercial de bovinos de producción de carne destinados a corrales de engorda o para la exportación, obteniendo a partir de éste resultados negativos tanto al aislamiento como a las pruebas confirmatorias de Inmunoperoxidasa y RT-PCR.

7 BIBLIOGRAFÍA

- ASERCA. 1995. El Ganado Vacuno en México. In: Secretaría de Agricultura GyDR, editor. México: Revista de Publicación Mensual. p Pág. 4-27.
- Avalos-Ramirez R. 2012. Prevalencia serológica e importancia de las enfermedades infecciosas que afectan a la reproducción de bovinos en el estado de Nuevo León. In: CUERPO ACADÉMICO DE EPIDEMIOLOGÍA VETERINARIA FMVZ. Guadalupe N.L: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEON. p 63.
- Avalos-Ramirez R, Orlich M, Thiel HJ, Becher P. 2001. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286:456-465.
- Avalos Ramirez R. 2012. Prevalencia serológica e importancia de las enfermedades infecciosas que afectan a la reproducción de bovinos en el estado de Nuevo León. In: CUERPO ACADÉMICO DE EPIDEMIOLOGÍA VETERINARIA FMVZ. Guadalupe N.L: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEON. p 63.
- Bachofen C, Braun U, Hilbe M, Ehrensperger F, Stalder H, Peterhans E. 2009. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet Microbiol.*
- Baker JC. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc* 190:1449-1458.
- Baker JC. 1995a. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11:425-445.
- Baker JC. 1995b. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 11:425-445.

- Becher P, Avalos Ramirez R, Orlich M, Cedillo Rosales S, Konig M, Schweizer M, Stalder H, Schirrmeyer H, Thiel HJ. 2003. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311:96-104.
- Becher P, Orlich M, Kosmidou A, Konig M, Baroth M, Thiel HJ. 1999. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262:64-71.
- Becher P, Orlich M, Shannon AD, Horner G, Konig M, Thiel HJ. 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol* 78 (Pt 6):1357-1366.
- Becher P, Orlich M, Thiel HJ. 1998a. Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol* 72:5165-5173.
- Becher P, Orlich M, Thiel HJ. 1998b. Ribosomal S27a coding sequences upstream of ubiquitin coding sequences in the genome of a pestivirus. *J Virol* 72:8697-8704.
- Becher P, Orlich M, Thiel HJ. 2001. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J Virol* 75:6256-6264.
- Beer M, Hehnen HR, Wolfmeyer A, Poll G, Kaaden OR, Wolf G. 2000. A new inactivated BVDV genotype I and II vaccine. An immunisation and challenge study with BVDV genotype I. *Vet Microbiol* 77:195-208.
- Bitsch V, Hansen KE, Ronsholt L. 2000. Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994-1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Vet Microbiol* 77:137-143.
- Bolin SR. 1995. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11:615-625.

- Bolin SR, Ridpath JF. 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *American Journal of Veterinary Research* 53:2157-2163.
- Bosch JC, Kaashoek MJ, Kroese AH, van Oirschot JT. 1996. An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. *Veterinary Microbiology* 52:223-234.
- Brock KV. 2004. Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 20.
- Brock KV, Chase CC. 2000. Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Vet Microbiol* 77:209-214.
- Brock KV, Grooms DL, Ridpath J, Bolin SR. 1998. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* 10:22-26.
- Brownlie J, Clarke MC, Hooper LB, Bell GD. 1995. Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet Rec* 137:58-62.
- Cedillo Rosales S. 2005. Charakterisierung ruminanter Pestiviren mittels Polymerasekettenreaktion und monoklonaler Antikörper. In. Gießen: Universitätsbibliothek.
- Colett MS, Larson R, Gold C, Strick D, Anderson DK, Purchio AF. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165:191-199.
- Corapi WV, Elliott RD, French TW, Arthur DG, Bezek DM, Dubovi EJ. 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc* 196:590-596.

- Corapi WV, French TW, Dubovi EJ. 1989. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J Virol* 63:3934-3943.
- Cortese VS, West KH, Hassard LE, Carman S, Ellis JA. 1998. Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhea virus. *J Am Vet Med Assoc* 213:1312-1319.
- Cotrino B. 2003. IBR Y DVB, su importancia en reproducción. In: Memorias, seminario, taller “Actualización en IBR y DVB 2003 aspectos moleculares epidemiológicos y de control. Colombia, Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Dekker A, Wensvoort G, Terpstra C. 1995. Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross neutralization assays. *Vet Microbiol* 47:317-329.
- Deregt D, Loewen KG. 1995. Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. *Can Vet J* 36:371-378.
- Deregt D, Prins S. 1998. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase monolayer (micro-isolation) assay for detection of type 1 and type 2 bovine viral diarrhea viruses. *Can J Vet Res* 62:152-155.
- Dieguez FJ, Yus E, Vilar MJ, Sanjuan ML, Arnaiz I. 2009. Effect of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection on dairy calf rearing. *Res Vet Sci* 87:39-40.
- Domínguez. 2009. Prevalencia y Factores de Riesgo asociados al virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBRV), Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), *Leptospira* sp y *Neospora caninum*, en hatos con sistema vaca-cría del estado de Nuevo León. In: Departamento de virología de la Facultad de

- Medicina Veterinaria y Zootécnia. UANL. Monterrey: Universidad Autónoma Nuevo León. p 30-32.
- Donis RO, Dubovi EJ. 1987. Characterization of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *The Journal of general virology* 68 (Pt 6):1597-1605.
- Dubovi EJ. 1990. Molecular biology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev Sci Tech* 9:105-114.
- Dubovi EJ. 1994. Impact of bovine viral diarrhoea virus on reproductive performance in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 10:503-514.
- Edmondson MA, Givens MD, Walz PH, Gard JA, Stringfellow DA, Carson RL. 2007. Comparison of Tests for Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Diagnostic Samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19:376-381.
- Endsley JJ, Quade MJ, Terhaar B, Roth JA. 2002. Bovine viral diarrhoea virus type 1- and type 2-specific bovine T lymphocyte-subset responses following modified-live virus vaccination. *Vet Ther* 3:364-372.
- Evermann JF, Ridpath JF. 2002. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Vet Microbiol* 89:129-139.
- Fauquet CM. 2005. *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: Academic Press.
- Flores EF, Gil LH, Botton SA, Weiblen R, Ridpath JF, Kreutz LC, Pilati C, Driemeyer D, Moojen V, Wendelstein AC. 2000. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet Microbiol* 77:175-183.

- Fredriksen B, Press CM, Loken T, Odegaard SA. 1999. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 64:109-122.
- Fulton RW, Briggs RE, Ridpath JF, Saliki JT, Confer AW, Payton ME, Duff GC, Step DL, Walker DA. 2005. Transmission of bovine viral diarrhea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. *Can J Vet Res* 69:161-169.
- Fulton RW, Hessman BE, Ridpath JF, Johnson BJ, Burge LJ, Kapil S, Braziel B, Kautz K, Reck A. 2009a. Multiple diagnostic tests to identify cattle with Bovine viral diarrhea virus and duration of positive test results in persistently infected cattle. *Can J Vet Res* 73:117-124.
- Fulton RW, Johnson BJ, Briggs RE, Ridpath JF, Saliki JT, Confer AW, Burge LJ, Step DL, Walker DA, Payton ME. 2006. Challenge with Bovine viral diarrhea virus by exposure to persistently infected calves: protection by vaccination and negative results of antigen testing in nonvaccinated acutely infected calves. *Can J Vet Res* 70:121-127.
- Fulton RW, Ridpath JF, Saliki JT, Briggs RE, Confer AW, Burge LJ, Purdy CW, Loan RW, Duff GC, Payton ME. 2002. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Can J Vet Res* 66:181-190.
- Fulton RW, Whitley EM, Johnson BJ, Ridpath JF, Kapil S, Burge LJ, Cook BJ, Confer AW. 2009b. Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. *Can J Vet Res* 73:283-291.

- Givens MD, Marley MS, Riddell KP, Galik PK, Stringfellow DA. 2009. Normal reproductive capacity of heifers that originated from in vitro fertilized embryos cultured with an antiviral compound. *Anim Reprod Sci* 113:283-286.
- Gómez-Pacheco JM. 2009. Seroprevalencia de las infecciones por el virus Diarrea Vírica Bovina en ganado bovino en Andalucía. *REDVET* Vol. 10, Nº 2,:12.
- Goyal SM, Bouljihad M, Haugerud S, Ridpath JF. 2002. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from an alpaca. *J Vet Diagn Invest* 14:523-525.
- Hamers C, Couvreur B, Dehan P, Letellier C, Lewalle P, Pastoret PP, Kerkhofs P. 2000. Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea virus strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Vet J* 160:250-258.
- Hamers C, Di Valentin E, Lecomte C, Lambot M, Joris E, Genicot B, Pastoret PP. 2002. Virus neutralising antibodies against 22 bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves. *Vet J* 163:61-67.
- Harlow E. 1999. *Using antibodies: A laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, N.Y.)
- Harlow E, Lane D. 1999. *Using Antibodies: a Laboratory Manual*.
- Hilbe M, Stalder H, Peterhans E, Haessig M, Nussbaumer M, Egli C, Schelp C, Zlinszky K, Ehrensperger F. 2007. Comparison of Five Diagnostic Methods for Detecting Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection in Calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19:28-34.
- Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 64:89-107.
- Houe H, Lindberg A, Moennig V. 2006. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest* 18:427-436.

- Laddomada A. 2000. Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Vet Microbiol* 73:121-130.
- Lértora WJ. 2003. DIARREA VIRAL BOVINA: ACTUALIZACIÓN. In: Cátedra de Patología General y Sistemática. Corrientes, Argentina: Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE.
- Lindberg A, Brownlie J, Gunn GJ, Houe H, Moennig V, Saatkamp HW, Sandvik T, Valle PS. 2006. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties* 25:961-979.
- Lindberg AL, Alenius S. 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol* 64:197-222.
- Lindberg ALE. 2003. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control - A review. *Veterinary Quarterly* 25:1-16.
- Loneragan GH, Thomson DU, Montgomery DL, Mason GL, Larson RL. 2005. Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in feedlot cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226:595-601.
- Meyers G, Rumenapf T, Thiel HJ. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171:555-567.
- Meyers G, Thiel HJ. 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res* 47:53-118.
- Moennig V, Houe H, Lindberg A. 2005. BVD control in Europe: current status and perspectives. *Animal Health Research Reviews* 6:63-74.
- Muñoz-Zanzi CA, Johnson WO, Thurmond MC, Hietala SK. 2000. Pooled-Sample Testing as a Herd-Screening Tool for Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus

- Persistently Infected Cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12:195-203.
- Niskanen R, Alenius S, Belak K, Baule C, Belak S, Voges H, Gustafsson H. 2002. Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes. *Reprod Domest Anim* 37:171-175.
- Nuotio L, Juvonen M, Neuvonen E, Sihvonen L, Husu-Kallio J. 1999. Prevalence and geographic distribution of bovine viral diarrhoea (BVD) infection in Finland 1993-1997. *Vet Microbiol* 64:231-235.
- Obando RC, Hidalgo M, Merza M, Montoya A, Klingeborn B, Moreno-Lopez J. 1999. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). *Prev Vet Med* 41:271-278.
- OIE, editor. 2004. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*, Quinta Edición ed.
- Reddy JR, Xue W, Rivera S, Minocha HC. 1995. Antigenic differences between a field isolate and vaccine strains of bovine viral diarrhoea virus. *J Clin Microbiol* 33:2159-2161.
- Ridpath JF, Chiang YW, Waldbillig J, Neill JD. 2009. Stability of Bovine viral diarrhoea virus antigen in ear punch samples collected from bovine fetuses. *J Vet Diagn Invest* 21:346-349.
- Ridpath JF, Hietala SK, Sorden S, Neill JD. 2002. Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhoea infections. *J Vet Diagn Invest* 14:303-307.

- Ridpath JF, Neill JD, Endsley J, Roth JA. 2003. Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhoea virus in calves.
- Ridpath JF, Neill JD, Frey M, Landgraf JG. 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol* 77:145-155.
- Rivera G. H. 2008. Evolución del conocimiento sobre la enfermedad de la diarrea viral bovina y su agente etiológico. *Rev. investig. vet. Perú* vol.19:p.93-112.
- Rossmann W, Deinhofer M, Janacek R, Trampler R, Wilhelm E. 2009. Voluntary and compulsory eradication of bovine viral diarrhoea virus in Lower Austria. *Vet Microbiol*.
- Rumenapf H-Ja. 2008. *Molecular Biology of pestiviruses*, Caister Academic Press ed.
- Rumenapf T, Unger G, Strauss JH, Thiel HJ. 1993. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol* 67:3288-3294.
- Ryan MD, Monaghan S, Flint M. 1998. Virus-encoded proteinases of the Flaviviridae. *J Gen Virol* 79 (Pt 5):947-959.
- Sandvik T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol* 64:123-134.
- Sandvik T. 2004. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20:151-169.
- Scherer CF, Flores EF, Weiblen R, Caron L, Irigoyen LF, Neves JP, Maciel MN. 2001. Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and fetus. *Vet Microbiol* 79:285-299.

- Segura-Correa J, Solorio-Rivera J, Sánchez-Gil L. 2010. Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herds of Michoacan, Mexico. *Tropical Animal Health and Production* 42:233-238.
- Solis-Calderon JJ, Segura-Correa VM, Segura-Correa JC. 2005. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk factors. *Prev Vet Med* 72:253-262.
- Stoffregen B, Bolin SR, Ridpath JF, Pohlenz J. 2000. Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. *Vet Microbiol* 77:157-162.
- Tajima M. 2004. Bovine viral diarrhea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. *Veterinary Microbiology* 99:131-138.
- Tautz N, Kaiser A, Thiel HJ. 2000. NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* 273:351-363.
- Tautz N, Meyers G, Thiel HJ. 1998. Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. *Clin Diagn Virol* 10:121-127.
- Thiel HJ, Oechsler WA, Kastura B, Meier J, Schneider T, Freundl K, Dinkel M. 1996. [Costs-proceeds calculation for radiotherapy; comment]. *Strahlenther Onkol* 172:128-147; discussion 154.
- Thurmond MC, Munoz-Zanzi CA, Hietala SK. 2001. Effect of calfhood vaccination on transmission of bovine viral diarrhea virus under typical drylot dairy conditions. *J Am Vet Med Assoc* 219:968-975.

- Valle PS, Martin SW, Skjerve E. 2001. Time to first calving and calving interval in bovine virus diarrhoea virus (BVDV) sero-converted dairy herds in Norway. *Prev Vet Med* 51:17-36.
- Van Oirschot JT. 1983. Congenital infections with nonarbo togaviruses. *Vet Microbiol* 8:321-361.
- van Oirschot JT. 1999. Diva vaccines that reduce virus transmission. *J Biotechnol* 73:195-205.
- van Oirschot JT, Brusckhe CJ, van Rijn PA. 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol* 64:169-183.
- Vilcek S, Belak S. 1996. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J Virol Methods* 60:103-108.
- Vilcek S, Belak S. 1997. Organization and diversity of the 3'-noncoding region of classical swine fever virus genome. *Virus Genes* 15:181-186.
- Vilcek S, Durkovic B, Kolesarova M, Paton DJ. 2005. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev Vet Med* 72:31-35; discussion 215-219.
- Weber MF, Verhoeff J. 2001. [Integrated disease control in dairy herds. A case study from the veterinarians' viewpoint.]. *Tijdschr Diergeneeskd* 126:340-345.
- Zimmer GM, Van Maanen C, De Goey I, Brinkhof J, Wentink GH. 2004. The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples. *Veterinary Microbiology* 100:145-149.

ANEXOS

Preparación de Buffer SB 30X

- ✓ Pese 35gr de ácido bórico (F.W. 61.83) y 6gr de NaOH (F.W. 39.99711).
- ✓ Coloque los reactivos en un frasco o matraz con capacidad de 1 L.
- ✓ Agregue 1 L de H₂O mQ o H₂O destilada
- ✓ Ajuste a un pH 8.0 con NaOH
- ✓ Esterilice esta Solución

NOTA: Esta es la Solución Stock (Matriz).

Preparación de Buffer SB 1X (0.028 M)

- ✓ Mezcle 50 ml de Buffer SB 30X con 950 ml de H₂O destilada

NOTA: Esta es la solución de trabajo.

Esta es la solución utilizada para preparar la agarosa y para cargar la cámara de electroforesis.

Preparación de Buffer PBS 1X

- ✓ Mida 90 ml de H₂O destilada estéril, con probeta.
- ✓ Mida 10 ml de PBS 10X GIBCO® INVITROGEN™ con probeta.
- ✓ Mezcle por inversión estas dos soluciones.
- ✓ Coloque la mezcla en un frasco con tapa.

NOTA: Puede guardar a temperatura ambiente o en refrigeración de 4 a 8° C

Preparación de Etanol al 70% (Para Desinfectar)

- ✓ Mida en probeta 700 ml de etanol grado analítico.
- ✓ Mida en la probeta 300 ml de H₂O destilada
- ✓ Mezcle las soluciones y guarde a temperatura ambiente en un recipiente con rosca.

NOTA: tenga cuidado al mezclar estos reactivos ya que generan calor y presión durante este proceso.

Agarosa al 1.5%

- ✓ Pese 1.5% de agarosa
- ✓ Coloque la agarosa en un matraz limpio
- ✓ Agregue 100 ml de buffer SB 1X y mezcle.
- ✓ Caliente en microondas aproximadamente 1^{1/2} minutos o hasta observar la mezcla cristalina.

NOTA: el proceso de calentamiento puede ser muy peligroso, use guantes protectores durante el proceso de preparación.

PROTOCOLO ESTÁNDAR DE TRABAJO PARA DL-UV-007/5/PV-PCR

Detección y diferenciación de genoma de *Pestivirus* mediante La Transcripción

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

Objetivo: Protocolo de trabajo para la realización y análisis de la Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección cualitativa del genoma de *Pestivirus* en materiales de prueba de rumiantes.

Instrucciones de trabajo

Materiales

Control (positivo): Sobrenadante y material celular de células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney; ATCC CCL-22) infectadas con el *Virus de la Diarrea Viral Bovina* (BVDV cepa NADL).

Control (negativo): Sobrenadante y material celular de células MDBK.

Control de contaminación: Agua doblemente destilada para PCR, utilizada durante la preparación de ácidos nucleicos.

Material de prueba: muestras sanguíneas con anticoagulante (EDTA o Li-Heparina), hisopados nasales o muestras de tejidos.

Enzimas y Buffer y Kits

Ver SAV045/SAV017

METODOLOGÍA PARA RT-PCR PARA MIEMBROS DEL GÉNERO *PESTIVIRUS*

Iniciadores

Todos los iniciadores se sintetizarán por la firma MWG y serán liofilizados. Los iniciadores se reconstituirán con Agua dd_{PCR} (concentración final de 50µM) y se conservarán en alícuotas de 20µl a -20°C.

Iniciadores para el diagnóstico rápido de miembros de las diferentes especies de *Pestivirus* (5'UTR)

OL 380R (reverso-antisentido) **5' AAC TCC ATG TGC CAT GTA GAG 3'**

OL 100 (codificante-sentido) **5' CAT GCC C (AT) (TC) AGT AGG ACT AGC 3'**

OL 200 (reverse-antisentido) **5' GGG CAT GCC CTC GTC CAC 3'**

Procedimiento para la detección de miembros del género *Pestivirus*

Manejo de las muestras

El procesamiento de las muestras se realiza en el Laboratorio de Virología según los el protocolo SAV 017 Preparación de ácidos nucleicos.

Amplificación del genoma

La preparación de los “Mastermix” así como la colocación de estos mix en los tubos para cada reacción se realizarán bajo la cabina para PCR.

La amplificación del ARN extraído se realizará en un termociclador en el laboratorio de genética. Se colocaran alternadamente un control de contaminación (Agua doblemente destilada para PCR) y una muestra (ARN extraído a partir del material de prueba). Además se agregará al final de cada raya de muestras un control negativo (ARN extraído de células no infectadas) así como un control positivo (ARN preparado a partir de células infectadas o sobrenadante).

Transcripción reversa- Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Se preparará la cantidad necesaria de Start-Mastermix (Iniciadores y Agua dd_{PCR}) (Cabina para PCR cuarto oscuro). Las cantidades de reactivos utilizadas varían de acuerdo a cada RT-PCR, a la concentración de los iniciadores y al número de iniciadores agregados en la mezcla del RT-PCR (ver tabla 1).

	Concentración de Primer	Concentración final de primer por reacción	Volumen en μ l de primer por reacción	Volumen en μ l de agua dd _{PCR} por reacción	Volumen inicial de Start Mastermix por reacción
OL 380R	50 μ M	25nM	0.5 μ l	20.5 μ l	21 μ l
OL380R	100 μ M	20nM	0.2 μ l	21.1 μ l	21.3 μ l

Tabla. 1 Volumen de H₂O según la concentración del iniciadores utilizados en el RT-PCR

- Se colocan inicialmente en un tubo para PCR de 0.2 ml un volumen final de Start Mastermix de 21/21.3µl.
- Se añaden 2.5µl del ARN preparado así como Agua dd_{PCR} (control de contaminación) y control positivo y negativo, se incuba la reacción a 94°C por 3 min. para desnaturalizar el ARN y finalmente se enfría la reacción a 4°C.
- Después de la desnaturalización inicial del ARN se agregan por cada reacción 26.5/26.2µl del resto del RT-PCR-Mix (campana de PCR).
- 25 µl de 2X Reaction mix y
- 1µl de RT/ Platinum *Taq* Mix
- 0.5 µl OL 100 (50µM)/ 0.2 µl OL 100 (100µM)

Se colocan los tubos nuevamente en el termociclador para la producción de ADNc. La transcripción reversa (1 ciclo de: 50°C-30 min.; desnaturalización de la transcriptasa reversa (94°C-30 sec.); amplificación del ADNc con más de 30 ciclos (normalmente 94°C-30 sec.; 55°C-30 sec.; 72°C-30 sec.), finalmente se da un paso de amplificación final a 72°C por 5-10 min., bajando la temperatura por último a 4°C).

Al finalizar la RT-PCR se continúa con el PCR anidado (nested PCR). Los productos amplificados en las reacciones se conservarán a 4°C si se procesan durante las siguientes 12-24 horas, de lo contrario se almacenarán los productos a -20°C hasta su siguiente procesamiento.

Análisis de los productos amplificados

El análisis de las amplificaciones se realizó en el Laboratorio de Genética de acuerdo al protocolo SAV045.

Análisis e interpretación de los resultados

El método será validado de acuerdo a los siguientes criterios:

En ninguno de los controles de contaminación así como en los controles negativos deben aparecer bandas del tamaño de las bandas esperadas: 0.299 kB (1. ronda) así como 0.15 kB (2. ronda).

Para los controles positivos debe apreciarse claramente una banda del tamaño de 0.299 kB (1. ronda) así como de 0.15 kb (2. ronda).

Se han cumplido los criterios 1 + 2, entonces será válido el método. De no cumplirse uno de estos criterios, se deberá repetir la prueba.

Los resultados de las muestras a probar se analizarán de acuerdo a los siguientes criterios:

Resultado positivo

A la electroforesis aparecen bandas de un tamaño de 0.299 Kb (RT-PCR) y 0.15 Kb. (PCR anidado) o solo bandas en la electroforesis del PCR anidado de un tamaño de 0.15 kB

Resultado negativo

No aparecen bandas del tamaño esperado

Los resultados se interpretarán en conjunto con los síntomas clínicos como a continuación se describe:

Resultado positivo: Es seguro que existe una infección con *Pestivirus*. A través de un segundo muestreo tomado tres semanas más tarde, se aclarará si se presenta una infección aguda o se trata de una infección persistente.

Resultado negativo: resultados negativos no descartan totalmente y con seguridad la presencia de una infección con *Pestivirus*.

