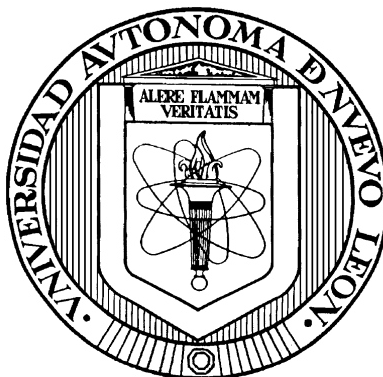


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**DETECCIÓN SEROLÓGICA, MOLECULAR Y FACTORES DE RIESGO DE**  
***PESTIVIRUS* EN HATOS CAPRINOS Y OVINOS**  
**DEL NORESTE DE MÉXICO**

**POR**

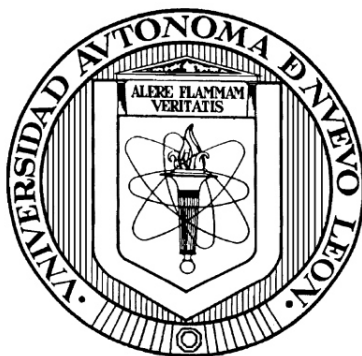
**ALEJANDRO JOSÉ RODRÍGUEZ GARCÍA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**MARZO, 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**DETECCIÓN SEROLÓGICA, MOLECULAR Y FACTORES DE RIESGO DE  
*PESTIVIRUS* EN HATOS CAPRINOS Y OVINOS  
DEL NORESTE DE MÉXICO**

**POR**

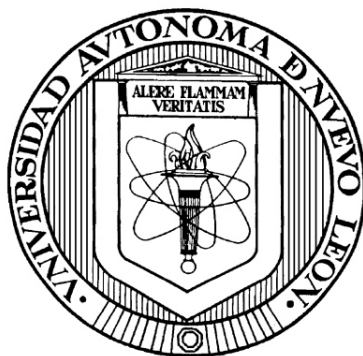
**ALEJANDRO JOSÉ RODRÍGUEZ GARCÍA**

**Como requisito parcial para obtener  
el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**MARZO, 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**DETECCIÓN SEROLÓGICA, MOLECULAR Y FACTORES DE RIESGO DE  
*PESTIVIRUS* EN HATOS CAPRINOS Y OVINOS  
DEL NORESTE DE MÉXICO**

**POR**

**ALEJANDRO JOSÉ RODRÍGUEZ GARCÍA**

**Como requisito parcial para obtener  
el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**MARZO, 2017**

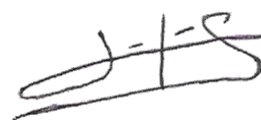
**DETECCIÓN SEROLÓGICA, MOLECULAR Y FACTORES DE RIESGO DE  
*PESTIVIRUS* EN HATOS CAPRINOS Y OVINOS  
DEL NORESTE DE MÉXICO**

**Aprobación de tesis**



---

Dr. Ramiro Ávalos Ramírez  
Director de tesis



---

Dr. José Segura-Correa  
Director Externo



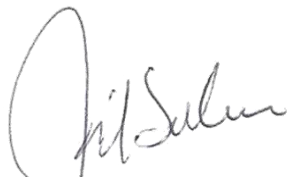
---

Dra. Sibilina Cedillo Rosales  
Co – Directora



---

Dr. Rubén Cervantes Vega  
Co – Director



---

Dr. José Antonio Salinas Meléndez  
Co – Director

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, necesito agradecer al Dr. Ramiro Ávalos Ramírez, por recibirme como su asesorado de maestría, el creer en mí, apoyarme y siempre impulsarme en ser mejor cada día, siempre leyendo, estudiando, aprendiendo nuevas técnicas, pero al mismo tiempo ser una mejor persona y agradecer cada día lo mucho o poco que se tiene, y en tan solo dos años haberme transformado en un mejor profesional y persona.

A la Dra. Sibilina también le agradezco sus enseñanzas, ya que sin ella no entendería sobre biología molecular, además de la paciencia de tenerme como asesorado. Al Dr. Rubén Cervantes Vega por su conocimiento sobre Nuevo León y como es cada municipio del país, además de sus consejos de cómo llevar a cabo mi estudio y como moverme en Nuevo León, además de su amistad. Al Dr. José Antonio Salinas Meléndez y sus consejos sobre la tesis como tal, ya que me enseñó mucho, además de hacerme ver la realidad de las cosas que uno debe tener en mente, el ser centrado y sincero, pero sobre todo la amistad y el no quedarse de los brazos cruzados y tener siempre la iniciativa de seguir adelante.

Por último, agradezco al Dr. José Segura-Correa, de la Universidad Autónoma de Yucatán, por sus amplios conocimientos, además de como estructurar mi tesis estadísticamente, el me enseñó muchas cosas, que no hubiera podido realizar sin

su ayuda, además de ayudarme desde tan lejos y siempre estar pendiente de mi trabajo.

Agradezco a cada uno de mis compañeros de generación de la maestría, a Carolina, Selene, Itzel, Ramiro, Eduardo, Rolando, Rubín y Emmanuel, por ser unos grandes amigos tanto en clase como afuera de la facultad, les agradezco el haberme acompañado y ser las mejores personas con este extranjero que no tenía nada al llegar a Nuevo León.

También no puedo olvidar a cada uno de los Doctores y Doctoras que conocí durante la maestría, ya que poco a poco mientras avanzaba, me brindaban de su conocimiento y amistad, entre ellos se encuentran: a la MC. Cecilia Ramírez, MC. Eliud Obregón, al Dr. Uzziel Castillo, Dra. Diana Zamora por haberme aceptado en la maestría y ser una muy buena persona, Dr. Rogelio Ledezma, Dr. Jaime Escareño, Dr. Wong. A la Dra. Alicia Marroquín, Dr. Francisco Mazcorro, al Dr. Marco Cantú, además de muchos otros, que tal vez no nombre, pero siempre están en mi mente.

Por último, al CONACYT por concederme la beca y el apoyo económico, además agradezco mucho al posgrado conjunto por aceptarme en este programa de maestría, y el tenerme acá durante dos años, pero gracias a ellos soy el profesional que soy y lo atesorare durante cada día de mi vida.

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la oportunidad de tener vida y tener esta misma cada día al levantarme de mi cama. A mis padres Eduardo Rodríguez y Sonia García, por apoyarme durante 27 años de mi vida, creer en mí, además de estar en buenos y malos momentos, por enseñarme a ser una persona de bien y ser una persona productiva a la vida. Y que han formado a un gran hijo y profesional, espero enorgullecerlos cada día, debido a que han dado de ellos más de lo que uno puede pedir, y que sin ellos no estaría donde estoy ahora. A mis hermanos Ingrid y Eduardo por ser una gran compañía, a pesar de estar lejos siempre se recuerdan de mí.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la misma, por permitirme estudiar en una institución tan prestigiosa e inculcarme tanto conocimiento a lo largo de dos años. A mis asesores, ya que, sin sus consejos, guías, regaños, además de su amistad, ya que son personas a las cuales respeto y admiro mucho, gracias por ser parte de mi tesis y vida.

Al laboratorio de virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, ya que sin este lugar no estaría donde estoy, además agradezco a las personas que conocí ahí y me dieron su amistad incondicional, además de sus alegrías y reprensiones; gracias por todo a Leslee su paciencia, enseñanzas y compañía y mucho más, a Carlos Badillo, Mariano, Nícte y Adrián. A cada una de las personas de los diferentes laboratorios que me ayudaron durante el desarrollo

de mi tesis además de enseñanzas, Erica, Mauricio, Cynthia, Ramón, Gaby y en especial a César Dávila por permitirme vivir en su casa, hacerme sentir parte de una familia y en especial por aguantarme, gracias.

A mis amigos de generación, por aceptarme en su grupo y tratarme de una gran manera a Carolina por su aceptación y paciencia conmigo, Ramiro por ser la primera persona en brindarme su amistad, Selene por su determinación, Emmanuel por su alegría constante, Rolando por su espontaneidad, a Itzel por su jovialidad, a Eduardo por sus ocurrencias y Rubín por el respeto que nos mostrábamos el uno al otro.

A todos los compañeros y amigos que me han brindado sonrisas, alegrías, pero al mismo tiempo han visto mis penas y sufrimiento, pero en especial a Iliana, Kevin, Karen, Daniel, Luisa, Ricardo, Ingrid, Chema, Sebastián, Marta, Amy, Julio, a mis AMIGAS Ana, Citlaly gracias por ser unas grandes personas y aceptarme por un año y medio, a Juan Pablo y Fanny por su amistad y muchas personas más que conocí muy tarde y hubiera sido grato conocerlas por más tiempo, pero que a pesar que no aparezcan acá siempre pienso en ellos. Y por último extendiendo esta dedicatoria a todas aquellas personas que me ayudaron con mi estudio al Ing. Fernando Garza, a la Ing. Abigail y por último al Dr. Juan Manuel Huerta Cavazos, ya que sin ellos el estudio no se pudo haber terminado, además de sacrificar su tiempo, para ayudarme muchas gracias.

## ABREVIATURAS

A	Adenina
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido Ribonucléico mensajero
B	Citosina o Guanina o Timina
b	Pendiente de la curva
BDV	Virus de la Enfermedad de las Fronteras "Border Disease Virus"
BEL26	Células de Pulmón de embrión de bovino "Bovine Embryonic Lung"
BRSV	Virus Sincitial Respiratorio Bovino "Bovine Respiratory Syncytial Virus"
BVDV	Virus de la Diarrea Viral Bovina "Bovine Viral Diarrhea Virus"
cELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas por Competencia
CSFV	Virus de la Fiebre Porcina Clásica "Classical Swine Fever Virus"
°C	Grados centígrados
C	Proteína de la cápside
<b>C</b>	Citosina
CD46	Proteína Regulatoria de Complemento " <i>complement regulatory protein</i> "
CI	Intervalo de Confianza
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
cp	Citopático
CY3	Cianina
d	Precisión.
D	Efecto de diseño
<b>D</b>	Adenina o Guanina o Timina
DDR	Distritos de Desarrollo Rural
DMEM	Dulbecco's Medio Eagle Modificado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleótidos Trifosfatos
E1	Proteína de envoltura 1
E2	Proteína de envoltura 2
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a Enzimas
E <sup>rns</sup>	Proteína de envoltura (Ribonucleasa secretada)
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
G	Guanina
H	Adenina o Citosina o Timina
IHC	Inmunohistoquímica
IPO	Inmunofluorescencia
IRES	Sitio de Entrada Interno Ribosomal
IRF-3	Factor Regulador de Interferón tipo 3
IRF-7	Factor Regulador de Interferón tipo 7
K	Guanina o Timina
kDa	Kilodalton

M	Adenina o Citosina
MDBK	Células de riñón de Bovino "Madine Darby Bovine Kidney"
MD	Enfermedad de las Mucosas "Mucosal Disease"
Min.	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Mrad	Miliradian
n	Tamaño de la muestra
N	Tamaño de la población
<b>N</b>	Cualquier base nucleotídica (A, T, G, C)
ncp	No Citopático
nm	Nanómetros
N <sup>pro</sup>	Proteína no Estructural Secretora de Proteinasa
NS2	Proteína no Estructural NS2I
NS3	Proteína no Estructural NS3
NS4A	Proteína no Estructural NS4A
NS4B	Proteína no Estructural NS4B
NS5A	Proteína no Estructural NS5A
NS5B	Proteína no Estructural NS5B
NTPasa	Pirofosfatasa Nucleósido Trifosfato
- o -	Brecha
ORF	Marco Abierto de Lectura
OR	Razón de Momios, Razón de probabilidades, del inglés " <i>Odds Ratio</i> "
p	Prevalencia Esperada
P	Probabilidad
pb	Pares de bases
p7	Proteína no Estructural p7
p80	Proteína p80 (NS3)
P80/P125	Proteína NS2-3
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI	Animal Persistentemente Infectado
PI3	Virus de la Parainfluenza 3
PROGAN	Producción Pecuaria Sustentable y Ordenamiento Ganadero y Apícola
q	1-p
R	Adenina o Guanina
RdRp	ARN-Polimerasa dependiente de ARN
Rpm	Revoluciones por Minuto
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
S	Guanina o Citosina
SAS	Statistical Analysis Software
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SE	Suero Equino
<b>SE</b>	Error estándar
Seg	Segundos

SFT-R	Células de Timo de feto ovino "Sheep Fetal Thymoid"
T (o U)	Timina (o Uracilo)
TA	Temperatura Ambiente
TCID <sub>50</sub>	Dosis infectiva del 50% cultivo Celular, " <i>Tissue culture Infective Dose</i> "
UTR	Region no traducida " <i>Untranslated Region</i> "
V	Adenina o Citosina o Guanina
W	Adenina o Timina
WinEpi	Trabajando en Epidemiología "Working IN EPIdemiology"
w/v	Peso sobre volumen
X <sup>2</sup>	Prueba de Chi-Cuadrado
Y	Citosina o Timina
Z	Valor de la tabla de Z con un nivel de confianza del 95% (1.96)
μl	Microlitros
μM	Micromolar

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	iv
DEDICATORIA.....	xiii
ABREVIATURAS .....	xv
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	xviii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
1 ABSTRACT .....	1
2 RESUMEN .....	2
3 INTRODUCCIÓN .....	3
3.1 HIPÓTESIS .....	7
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	7
3.2.1 Objetivos Específicos.....	7
3.3 JUSTIFICACIÓN .....	7
4 LITERATURA REVISADA .....	8
4.1 Clasificación taxonómica .....	8
4.2 Importancia Económica .....	9
4.3 Espectro de Hospederos .....	11
4.4 Propiedades de los viriones de Pestivirus.....	12
4.4.1 Morfología de los Pestivirus .....	12
4.4.2 Genoma Viral de los Pestivirus .....	13
4.5 Proteínas codificadas en el genoma de Pestivirus.....	14
4.5.1 Proteínas estructurales .....	14
4.5.2 Proteínas no estructurales .....	17
4.6 Replicación de los Pestivirus .....	20
4.7 Propiedades antigénicas.....	22
4.8 Enfermedades causadas por Pestivirus en pequeños rumiantes.....	23
4.8.1 Enfermedad de las Fronteras.....	23

4.9	Otras Infecciones por Pestivirus en pequeños rumiantes.....	30
4.10	Diagnóstico de enfermedades causadas por Pestivirus. ....	31
4.10.1	Aislamiento Viral .....	32
4.10.2	Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en cultivo celular .....	34
4.10.3	Inmunoperoxidasa indirecta en cultivo celular .....	35
4.10.4	Ensayos de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISAS) .....	36
4.10.5	Métodos moleculares para el diagnóstico de infecciones por Pestivirus.....	39
4.11	Programas de control y erradicación de pestivirus en pequeños rumiantes. ....	41
4.12	Epidemiología de los Pestivirus en ovejas y caprinos .....	43
5	MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
5.1	MATERIAL.....	49
5.1.1	Equipos.....	49
5.1.2	Material biológico .....	50
5.1.3	Estuches comerciales. ....	50
5.1.4	Reactivos .....	51
5.2	METODOLOGÍA.....	52
5.2.1	Lugar y Procesamiento de las Muestras .....	52
5.2.2	Área de Muestreo.....	52
5.2.3	Especies animales incluidas en el estudio y tamaño de muestra. ....	53
5.2.4	Tipo de muestras .....	56
5.2.5	Metodología para la detección anticuerpos contra Pestivirus .....	57
5.2.6	Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	59
5.2.7	Extracción de ARN.....	59
5.2.8	Diseño de Primers para la RT-PCR .....	60
5.2.9	RT-PCR de la región 5 UTR' .....	61
5.2.10	PCR Anidado de la región 5´ UTR .....	65
5.3	Secuenciación y análisis de las secuencias.....	66
5.4	Análisis estadístico de resultados .....	68
6	RESULTADOS.....	70

6.1	Tamaño de Muestra.....	70
6.2	Serología.....	71
6.3	RT-PCR y PCR – Anidado.....	74
6.4	Secuenciación .....	79
7	DISCUSIÓN .....	81
8	CONCLUSIONES .....	97

## ÍNDICE DE TABLAS

1. Secuencias genómicas completas de cepas de <i>Pestivirus</i> usadas para el diseño de los primers. ....	62
2. Primers degenerados diseñados para amplificar diversos segmentos hacia la región 5' del genoma de <i>Pestivirus</i> . ....	63
3. Componentes del estuche comercial "Access RT-PCR System" .....	64
4. Componentes del estuche comercial "Taq- & GO™ Ready-to-use .....	66
5. Proporción de seropositividad contra <i>Pestivirus</i> acorde a la especie. ....	71
6. Proporción de seropositividad contra <i>Pestivirus</i> en hatos ovinos o caprinos el estado de Nuevo León; México. ....	72
7.- Seropositividad contra <i>Pestivirus</i> y distribución por hato de especie acorde al Distrito de Desarrollo Rural (DDR). ....	75
8. Factores de Riesgo Asociados a la Presencia de <i>Pestivirus</i> en Rumiantes Pequeños. 76	

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Inmunofluorescencia Indirecta de una infección por <i>Pestivirus</i> en células MDBK. ....	35
2. Inmunoperoxidasa Indirecta de una infección por <i>Pestivirus</i> en células MDBK. ....	36
3. Distritos de Desarrollo Rural (DDR's) del estado de Nuevo León; México. ....	54
4. PCR anidado para la amplificación de un segmento de la región 5' UTR de <i>Pestivirus</i> en muestras de plasma de ovinos y caprinos procedentes de hatos con elevada seropositividad. ....	79

## 1 ABSTRACT

This study estimated *Pestivirus* infections and seropositivity frequency at herd-level, species and region. Also, evaluated risk factors associated to small ruminants in Nuevo León, México. A total of 840 serum samples of different economical regions (DDR) were obtained from July 2015 to August 2016. 67 caprine and 52 ovine herds where analyzed by a commercial ELISA test. Moreover, a survey was focused to detected risk factors that influenced presence of Pestiviruses. In addition to this, pools of plasma coming of animals having over 90% seropositive or seronegative herds where analyzed by RT-PCR and nested PCR. Also, oligonucleotides where designed that recognize *Pestivirus* conserved genetic sequences. General seroprevalence found was 44.3% (177/399) and 29.7% (131/441) for goats and sheep's, respectively. Furthermore, the presence of at least one seropositive animal in herds presented 90.3% (47/52) and 61.9% (41/67) for ovine and caprine flocks. Also, DDR seropositivity was between 43.5 to 44.2% for Anáhuac (49/134), Montemorelos (50/113), Galeana (124/285) and only 24.3% (75/308) for Apodaca. However, serologic distribution not only was different among regions, but also this result had higher indexes in the sheep of the state. Features such as regions, herd size, type of production, presence of wild animals, low weight at birth, low growth rating, introduction of new animals, absence of quarantine and veterinarian assistance established a high association by Chi-square test ( $P < 0.0001$  –  $P < 0.01$ ). Risk factors ( $P < 0.05$ ): Region (Montemorelos; OR 3.0; CI 95%, 1.7-5.1; Galeana; OR: 2.2; CI 95%, 1.3-3.9; Anáhuac OR: 2.0; CI 95%, 1.1 – 3.5), Ovine OR: 2.3; CI 95%, 1.2 – 4.3; veterinary assistance OR: 1.8; CI 95%, 1.2-2.8; milk production system OR: 1.5; CI 95%, 0.8-2.7; presence of other domestic animals OR: 1.4; CI 95%, 0.9-2.3; introduction of sheep's/goats OR: 0.6; CI 95%, 0.3-0.9 and not applying quarantine OR: 0.5; CI 95%, 0.3-1.0. RT-PCR/nPCR discovered genetic sequences of *Pestivirus* in 5 of 21 pool samples (3 sheep and 2 goat's herds) with high seroprevalence herd rate. The fragment of 167 pb of such amplicons revealed >99% similarity within a highly-conserved region inside the 5'UTR *Pestivirus* BVDV-1 sequence. In conclusion, this indicates presence of a high circulation of *Pestivirus* in small ruminant's herds and probably in other susceptible species in the area. This analysis provides fundamentals to stablish programs focused on the control and prevention of diseases associated to *Pestivirus* and reinforced biosecurity protocols.

Keywords: *Pestivirus*, seroepidemiology, risk factors, sheep, goats, biosecurity, Nuevo León, México.

## 2 RESUMEN

El propósito del presente estudio transversal fue estimar la frecuencia de seropositividad nivel de hatos, especie, región y los factores de riesgo asociados a la infección por Pestivirus en caprinos y ovinos en Nuevo León, México. Un total de 840 muestras de suero, obtenidas desde julio del 2015 a agosto del 2016 de distintas regiones económicas (DDR), a partir de 67 y 52 hatos caprinos y ovinos, respectivamente; fueron analizadas mediante ELISA comercial. Un cuestionario estructurado enfocado a detectar factores de riesgo para la presencia de Pestivirus fue aplicado a los propietarios al momento del muestreo. Además, un coctel de plasmas de animales seropositivos o seronegativos de hatos con seropositividad >90% fueron analizados mediante RT-PCR y PCRanidado (RT-PCR/PCRa), usando oligonucleótidos diseñados para reconocer regiones genéticas conservadas de *Pestivirus*. La seroprevalencia general por especie fue 44.3% (177/399) y 29.7% (131/441) para ovinos y caprinos, respectivamente. A nivel de hato el 90.3% (47/52) de los hatos ovinos y el 61.9% (41/67) de caprinos resultaron con al menos un animal seropositivo. Acorde al DDR la seropositividad fue de 43.5-44.2% para Anáhuac (59/134), Montemorelos (50/113) y Galeana (124/285) y de 24.3% (75/308) para Apodaca. No obstante, la distribución serológica por tipo de hato especie no fue homogénea de acuerdo a la región, resultando los ovinos con mayor índice de seroprevalencia en todas las regiones del estado. Una fuerte asociación ( $P < 0.0001$  -  $P < 0.01$ ) fue calculada mediante Chi-cuadrada entre la seropositividad con la región, tamaño de hato, tipo de explotación, presencia de animales silvestres, bajo peso al nacimiento, retraso del crecimiento, introducción de animales caprinos/ovinos, ausencia de cuarentena y asistencia veterinaria. Los factores de riesgo asociados ( $P < 0.05\%$ ) fueron: la región (Montemorelos; OR:3.0; CI:95%, 1.7-5.1; Galeana; OR:2.2; CI:95%, 1.3-3.9; Anáhuac OR:2.0; CI:95%, 1.1-3.5), ovinos OR:2.3; CI:95%, 1.2-4.3; asistencia de veterinario OR:1.8; CI:95%, 1.2-2.8; sistema de producción leche OR:1.5; CI:95%, 0.8-2.7; presencia de otros animales domésticos OR:1.4; CI:95%, 0.9-2.3; introducción de ovinos/caprinos OR:0.6; CI:95%, 0.3-0.9 y no aplicar cuarentena OR:0.5; CI:95%, 0.3-1.0. Los análisis de RT-PCR/PCRa evidenciaron secuencias genéticas de *Pestivirus*, en 5 de 21 mezclas de plasma (3 ovinos y 2 caprinos), de hatos con elevada seropositividad. La secuenciación de los fragmentos de 167 pb reveló >99% similaridad con una región muy conservada dentro de 5'UTR del VDVB-1. Todo lo anterior indica fuertemente la presencia y alta circulación de *Pestivirus* en rumiantes pequeños domésticos y probablemente en otras especies animales susceptibles de ésta área. Estos análisis proveen los fundamentos para el establecimiento de programas de salud animal enfocados en el control y prevención de las enfermedades asociadas *Pestivirus*, basados en instituir y reforzar la bioseguridad pecuaria.

Palabras claves: Pestivirus, seroepidemiología, factores de riesgo, ovinos, caprinos, bioseguridad pecuaria, Nuevo León, México.

### 3 INTRODUCCIÓN

Los virus son causantes de infección y daño en todos los tipos de sistemas celulares incluyendo procariontes y eucariotes. Lo más notable de estas entidades biológicas acelulares es que carecen de metabolismo, por lo que estrictamente deben de reconocer e internarse en una célula hospedadora a fin replicarse. La apropiación, modificación y uso de la maquinaria biosintética celular con propósito de replicar su material genético (ADN o RNA) y constituyentes, mediante la expresión de su material genético, conlleva a alteración de la homeostasis celular y por lo tanto una descompensación a nivel de tejidos, órganos y sistemas de los organismos (Koonin, Dolja, & Krupovic, 2015). Los virus sobreviven en las poblaciones animales cuando estos son transmitidos a través de la infección de nuevos individuos debido a la presentación de receptores que son reconocidos por los virus y que los utilizan como medio de entrada a las células. Dentro de las células el virus se replica, dando lugar a cambios en el genoma que genera la adaptación y evaluación de estos a la especie e inclusive pueden dar un salto interespecie.

Los miembros del género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* son los agentes causales de las enfermedades como la Diarrea viral Bovina; la Enfermedad de las Fronteras (Border disease) y la Fiebre Porcina Clásica (Isken et al., 2014; Schmeiser, Mast, Thiel, & König, 2014). No obstante, dentro de este género se ha reportado la circulación de aislados de los cuales aún no han sido clasificadas. Dentro de estos se incluye el virus Bungowannah hallado en un brote de cerdos

neonatales o que nacieron muertos en Australia; el virus de la Jirafa, encontrado en un foco de la enfermedad de las mucosas dadas en Kenia (Becher et al., 2014) y aislados de jirafas; el virus atípico de pestivirus el cual fue encontrado en Europa en un suero de feto bovino (Bauermann, Ridpath, Weiblen, & Flores, 2013; Decaro et al., 2014); y el virus Pronghorn aislado de un antílope americano ciego (Bauermann et al., 2013; Neill et al., 2014).

La sintomatología característica de las infecciones causadas por *Pestivirus* como enterorrea, emaciación, inanición, problemas reproductivos en hembras, problemas nerviosos en recién nacidos, causándoles ocasionalmente la muerte. Su importancia económica radica en su rápida diseminación y persistencia dentro de los artiodáctilos domésticos y silvestres, lo cual causa mermas económicas importantes (Tait et al., 2013) para los productores. Dentro de la canal de carne se pierden aspectos como marmoleo, peso de la carcasa y la carne magra lo cual representa pérdidas financieras, también causa reducciones en el crecimiento, un compromiso más laborioso con los animales retrasados en el peso ideal de venta, además de la aplicación constante de tratamientos costosos, los cuales no surten efecto de no ser diagnosticada esta enfermedad a tiempo.

Una particularidad de los *Pestivirus*, es el salto interespecie esto refiriéndose a que el virus puede afectar a más de una especie animal en particular, este género puede ser hallado dentro de variadas especies Artiodáctilas (Kautto et al., 2012) como

rumiantes domésticos y silvestres, los cuales pueden estar en contacto directo unos con otros (Casaubon, Vogt, Stalder, Hug, & Ryser-Degiorgis, 2012).

Su grandiosa capacidad para atravesar la placenta durante la preñez es causante de severos problemas reproductivos, entre ellos la reabsorción embrionaria, la muerte temprana de los fetos, malformaciones o el nacimiento de animales con anticuerpos dependiendo del periodo de infección de la hembra gestante. Si la infección se realiza en el primer tercio de la gestación antes que se desarrolle el sistema inmune se producirán animales persistentemente infectados (PI), los cuales producen una alta carga viral pero su organismo no forma una respuesta inmune contra ellos (Lanyon & Reichel, 2014).

Estos animales persistentemente infectados (infectados con virus no citopáticos) generalmente son de crecimiento retardado, débiles y más propensos a las infecciones del tracto digestivo y respiratorio. Si estos animales se superinfectan con otra cepa distinta y de tipo citopático pueden desarrollar una enfermedad llamada enfermedad de las mucosas (MD; por siglas en inglés Mucosal Disease), (Rajput et al., 2014) teniendo una mortalidad del 100%.

*Los Pestivirus* tienen distribución mundial y su prevalencia puede variar entre cada país y región del planeta, siendo esto un factor importante en la transmisión del virus entre las distintas especies animales. En el caso de México se tienen una prevalencia de 33.6% en bovinos (Segura-Correa, Domínguez-Díaz, Avalos-Ramírez, & Araez-

Sosa, 2010; Sánchez-Castilleja, Rodríguez Diego, Pedroso, & Cuello, 2012) de que se pueda transmitir este virus entre los animales, pero información acerca de caprinos u ovinos no se tienen en México y la prevalencia mundial oscila entre 2-25% (Bachofen, Vogt, et al., 2013).

Existen programas de control alrededor del mundo contra los *Pestivirus*, los cuales involucran un diagnóstico del hato para la infección, la implementación de un sistema de vacunación donde la enfermedad este presente, la implementación de medidas de bioseguridad en el hato, el diagnóstico de animales persistentemente infectados (identificación serológica, molecular y/o cultivo celular), (Dias et al., 2014) y la eliminación de los pl, constante monitoreo de los hatos (Lanyon & Reichel, 2014). Los modelos de control y erradicación dependen de la prevalencia y de las leyes de control que cada país y región.

La finalidad del presente estudio es reconocer la presencia, comportamiento epidemiológico y factores de riesgo asociados a *Pestivirus* en caprinos y ovinos del Noreste de México, mediante la determinación de la frecuencia serológica y molecular a nivel de especie, hato y región económica en el estado de Nuevo León.

### **3.1 HIPÓTESIS**

Dado el comportamiento biológico y epidemiológico que muestran los *Pestivirus* es factible su presencia y alta circulación hatos caprinos y ovinos del Noreste de México.

### **3.2 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la frecuencia serológica y molecular, así como factores de riesgo asociados a la infección por *Pestivirus* en ovinos y caprinos del Noreste de México.

#### **3.2.1 Objetivos Específicos**

- Determinar los índices de seropositividad, mediante cELISA comercial, contra *Pestivirus* a nivel de hato, especie y región económica en caprinos y ovinos de Nuevo León al Noreste de México.
- Estimar los factores de riesgo asociados a la seropositividad contra *Pestivirus* en hatos ovinos y caprinos de Nuevo León, México.
- Detectar secuencias genéticas de *Pestivirus* en hatos caprinos y ovinos mediante RT-PCR acoplada a PCR anidada.

### **3.3 JUSTIFICACIÓN**

Las características biológicas de los *Pestivirus*, entre ellas el “salto inter-especie” e inmunotolerancia, así como su asociación con efectos negativos en la producción, enfatiza la importancia de determinar si en hatos caprinos y ovinos del noreste de México; ocurre la presencia y circulación de estos virus. Conocer su presencia, seroprevalencia y factores de riesgo asociadas a la infección en estas especies, permitirá diseñar programas sanitarios de prevención, control y erradicación de las enfermedades asociadas a *Pestivirus*.

## 4 LITERATURA REVISADA

### 4.1 Clasificación taxonómica

El Comité Internacional de Taxonomía Viral es un organismo a nivel internacional que se encarga de agrupar los distintos tipos de virus en órdenes, familias, subfamilias, géneros, especies, subtipos, entre otros. Los criterios que toma en cuenta este comité para delimitar estas taxonomías son: la relación genéticas y antigénicas de los virus, el huésped de origen y el cuadro clínico que causan (Brown et al., 2012).

Para el caso de los *Pestivirus*, pertenecen a un grupo de virus RNA de cadena sencilla de polaridad positiva, la familia *Flaviviridae*. Esta familia consiste en cuatro géneros actualmente: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* (Riedel et al., 2012) y un nuevo género *Pegivirus* (Stapleton, Fong, Muerhoff, Bukh, & Simmonds, 2011). Los *Pestivirus* muestran gran similitud tanto en su estructura genómica como en el mecanismo de iniciación de la traducción con los *Hepacivirus* que otros miembros del género *Flavivirus* (King, 2012).

El género de los *Pestivirus* reconoce a cuatro especies, siendo estas: el Virus de la Fiebre Porcina Clásica (CSFV, de la terminología en inglés Classical swine fever virus) (Riedel et al., 2012), El Virus de la Diarrea Viral bovina tipo 1 y 2 (BVDV, de la terminología en inglés Bovine Viral Diarrea Virus) (King, 2012). El

Virus de la Enfermedad de las Fronteras (BDV, de la terminología en inglés Border Disease Virus) (Avalos Ramirez, 2002; Avalos-Ramirez, Orlich, Thiel, & Becher, 2001; Becher et al., 2003; King, 2012) y se proponen 4 especies atípicas conocidas como Giraffe, Hobi, Proghorne-Antelope y Bungowannah (Booth, Thomas, El-Attar, Gunn, & Brownlie, 2013) (Giangaspero, Apicella, & Harasawa, 2013).

#### **4.2 Importancia Económica**

Los *Pestivirus* son patógenos importantes en los distintos tipos de explotaciones comerciales a nivel mundial, especialmente dirigidas a rumiantes domésticos, los cuales causan pérdidas económicas severas (Bauermann et al., 2013; Xue, Mattick, Smith, & Maxwell, 2009). Esto es debido a que pueden darse enfermedades inaparentes e incluso severas, involucrando signología respiratoria, gastrointestinal, reproductiva, inmunológica y endocrina. Estas pérdidas en promedio rondan en £122 por animal en el caso de ovejas y se estima una pérdida aún mayor de casi £ 32 millones en la industria de pequeños rumiantes siendo más afectada la especie ovina. (Vickers & Wright, 2007)

La pérdida más importante es dada por los problemas reproductivos, debido a que el virus afecta el tracto genital en hembras, cruzando la barrera placentaria y por ende la infección del feto, causando complicaciones reproductivas como abortos, reabsorciones embrionarias, mortinatos o animales persistentemente infectados que pueden ser inaparentes a la enfermedad, estos últimos pueden presentar enfermedades secundarias o infecciones secundarias a *Pestivirus* que

al superinfectarse mueren debido a la enfermedad de las mucosas. Debido a que estas especies no es común vacunarlas contra *Pestivirus*, es normal el desconocimiento de la enfermedad en estos animales, causando como se mencionó pérdidas económicas en pequeños rumiantes.

La persistencia por parte de estos virus en ungulados puede deberse al ambiente, ya que estos virus han creado rangos de resistencia al ambiente con un promedio de 9 horas a 21°C o inclusive 67 horas a 4 °C de resistencia, lo cual puede producir una transmisión indirecta inter-especie (Kirchgessner, Dubovi, & Whipps, 2013).

Entre todo esto la única manera de mantener a los animales libres, es por medio de vacunación en el caso del ganado, pero esto puede causar desconcierto al momento del diagnóstico, causando resultados falsos debido a la circulación de antígenos vacunales contra *Pestivirus*. En las otras especies al no tener una vacuna contra la enfermedad el control se da aplicando medidas de bioseguridad en los hatos, la detección y eliminación de los animales persistentemente infectados, estas últimas medidas también se toman con el ganado bovino.

Dentro de las pérdidas que sufren los productores, se tiene un estudio por parte de Bauermann y colaboradores, en el cual se estima que más o menos por animal existe una pérdida de \$88 dólares (Bauermann, Flores, & Ridpath, 2012). En

Estados unidos un estudio demuestra que la diarrea viral bovina tiene una pérdida económica entre \$10 y \$40 millones de dólares por cada millón de terneros (Curti & Jaeger, 2013).

### **4.3 Espectro de Hospederos**

Los *Pestivirus* afectan a una amplia gama de miembros el orden de mamíferos ungulados (*Artiodactyla*). la cual representa a más de 50 especies de rumiantes y no rumiantes (Passler et al., 2014). No existen hospederos invertebrados. Los virus de este género infectan principalmente cerdos (CSFV) (Dias et al., 2014), rumiantes domésticos y silvestres (BVDV, BDV y otros especies atípicas) (Bachofen et al., 2014; Fernandez-Sirera et al., 2011; King, 2012; Martin et al., 2011).

La transmisión horizontal ocurre por contacto directo o indirecto (Ej. Secreciones nasales o urinarias, heces, alimento contaminado, pastas contaminadas etc.) (Bachofen, Vogt, et al., 2013) mientras que la transmisión vertical (transplacentaria) ocurre en todas las especies hospederas (Lamp et al., 2011). La mezcla en pastas de hatos bovinos, caprinos y ovinos, así como la cohabitación de praderas o pastas de rumiantes domésticos con los silvestres de la zona aumentan la posibilidad de saltos interespecies de estos virus.

Se han detectado rumiantes silvestres que han sido afectados o diagnosticados con presencia de antígenos o anticuerpos contra *Pestivirus* a diferencia de los

animales domésticos comúnmente conocidos, entre estos se encuentran la cabras de los pirineos (*Rupicapra pyrenaica*) (Fernandez-Sirera et al., 2014), jirafas (*Giraffa camelopardalis*) (Avalos-Ramirez et al., 2001), antílope americano (*Antilocapra americana*), venados rojos (*Cervus elaphus*), venado de corzo (*Capreolus capreolus*), Venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) búfalos (*Bubalus bubalis*), entre otras especies.

#### **4.4 Propiedades de los viriones de *Pestivirus***

##### **4.4.1 Morfología de los *Pestivirus***

Estudios de la morfología y estructura de los viriones de pestivirus reportan un tamaño en la mayoría de estos de 50 nm de diámetro (cerca del 2% con tamaño mayor a 65 nm) y con una forma esférica (Callens et al., 2016; Schmeiser et al., 2014). Poseen una envoltura lípoprotéica derivada de las membranas celulares (con contenido lipídico enriquecido de 2.3-3.5 veces más en colesterol, esfingomielina y hexocilceramidas y una reducción de 1.5-5 veces de fosfoglicéridos comparados con el contenido lipídico de las células de bovino (Callens et al., 2016), así como con 3 glicoproteínas E<sup>ms</sup>, E1 y E2 codificadas en el genoma viral y expresadas en el sistema endomembranoso de la célula infectada, las cuales son necesarias para el ingreso a la célula y la replicación viral (King, 2012; Schmeiser et al., 2014).

La cápside tiene un diámetro de 25 nm, está conformada por la proteína C. El genoma es una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva de alrededor de 12,300 pb (Brown et al., 2012).

#### 4.4.2 Genoma Viral de los Pestivirus

El virion posee un genoma de ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla de polaridad positiva de aproximadamente 12.4 kb. (Schmeiser et al., 2014). El genoma está dividido en dos regiones no codificantes o no traducibles, “5'-UTR (370-385 pb) y 3'-UTR (185-273 pb)” (de sus siglas en inglés Untranslated Region) y una región codificante o un marco de lectura abierta “ORF” (de las siglas en inglés “Open Reading Frame”) para una poliproteína. En la región 5'-UTR, carece de cap y contiene en su lugar un IRES (de sus siglas en inglés Internal Ribosome Entry Site) (Friis, Rasmussen, & Belsham, 2012; Lattwein, Klemens, Schwindt, Becher, & Tautz, 2012) que le permite ser traducido directamente por los ribosomas de la célula (Decaro et al., 2012). Ambas regiones poseen segmentos hipervariables y algunos muy conservados en todos los *pestivirus*.

El marco de lectura abierta del genoma codifica una poliproteína de 3,900 aminoácidos (Risager, Fahnøe, Gullberg, Rasmussen, & Belsham, 2013). Esta poliproteína se madura en las proteínas virales no estructurales y estructurales a través de cortes que se realizan durante y después de la traducción mediante

proteínas virales y celulares. El orden de las proteínas estructurales y no estructurales del gen es 5' -N<sup>pro</sup>-C-E<sup>rns</sup>-E1-E2-p7-NS2-3(NS2-NS3)-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3' (Aberle et al., 2014; King, 2012).

## **4.5 Proteínas codificadas en el genoma de *Pestivirus***

### **4.5.1 Proteínas estructurales**

Las proteínas que forman parte de los viriones (estructurales) son 4: una proteína que forma la cápside (proteína C, (14 kDa)) y 3 glicoproteínas que se encuentran dentro de la envoltura lípoprotéica, la proteína E<sup>rns</sup> (44/48 kDa), la proteína E1 (33 kDa) y la proteína E2 (55 kDa) (Riedel et al., 2012).

La Proteína de la Cápside (Proteína C) es polipéptido de entre 86-88 aminoácidos con un peso aproximado de 14 kDa. Presenta una casi toda la proteína es hidrofóbica a excepción de 6 aminoácidos en su terminación Carboxilo (ALLAWA). Este sitio hidrofóbico es procesado posteriormente por una enzima, la peptidasa del péptido-senial. De esta forma se une al ARN viral e inicia la morfogénesis del virus (Li et al., 2013).

Las tres glicoproteínas de la envoltura existen como complejos ligados por puentes disulfuro embebidos en una capa bilipídica con una concentración alta de colesterol, esfingomielina y hexocilceramidas: la glicoproteína E<sup>rns</sup> como

homodímero (Aberle et al., 2014) y las glicoproteínas E1 y E2 formando homodímeros (E2-E2) y heterodímeros (E1-E2) (King, 2012).

La glucoproteína E<sup>ms</sup> (E0, gp 44/48) con un total de 227 aminoácidos y un peso molecular entre 44-48 kDa, es altamente glucosilada (7-9 potenciales sitios de glucosilación de tipo N), así como cisteínas para la formación de puentes disulfuro para la formación de homodímeros, generalmente forma parte de la envoltura viral, pero también es secretada por las células infectadas. Aunque su actividad siendo una endoribonucleasa no es del todo clara, se sabe que es importante en la patogénesis ya que anticuerpos que inhiben su actividad ribonucleasa neutralizan su infectividad y mutaciones que eliminan la actividad ribonucleasa también atenúa al el virus in vivo (Riedel et al., 2012). Además, funciona como un ancla de membrana, también funciona como una peptidasa en la escisión del sitio entre esta misma y la proteína E1 y por último como una señal de retención y secreción en células infectadas (Aberle et al., 2014). Así mismo se ha observado en algunos estudios que previene la inducción de interferón (Iqbal, Poole, Goodbourn, & McCauley, 2004) . Así mismo en trabajos experimentales con Glucoproteína E<sup>ms</sup> recombinante se han detectado apoptosis en leucocitos de cerdos in vitro lo que podría estar ligado a la marcada leucopenia que se observan en infecciones naturales con algunas cepas de pestivirus (Bruschke, Hulst, Moormann, van Rijn, & van Oirschot, 1997; Susa, König, Saalmüller, Reddehase, & Thiel, 1992) .

La glucoproteína E1, es una proteína transmembranal de tipo 1 (33 kDa), y con un dominio N-terminal extracelular y uno C-terminal transmembranal, formando heterodímeros con la glucoproteína E2 (55 kDa), sugiriendo su participación como una proteína de fusión de membrana tipo II, pero ambas son necesarias para su adhesión a la célula. (El Omari, Iourin, Harlos, Grimes, & Stuart, 2013).

La glicoproteína E2 de los pestivirus, es una proteína transmembrana tipo 1 con un dominio N-terminal extracelular y uno C-terminal transmembrana con distinto tamaño en aminoácidos en las distintas especies de *pestivirus*, como se describe en el texto anterior forma homodímeros (E2-E2) y heterodímeros (E2-E1). Consta de 4 dominios DA, DB, DC, DD orientados de la parte N-terminal a la C-terminal. Posee 17 cisteínas conservadas en todas las especies de pestivirus que permiten la formación de enlaces disulfuro (1 enlace intramolecular y 8 intrermoleculares) para formar la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína. La proteína E2 tiene 4 glucosilaciones de tipo N (oligosacárido ligado a la asparagina) en los sitios N117, N186, N230, and N298. Los homodímeros de E2 están relacionados con el reconocimiento de receptores celulares y la infección celular, mientras que los heterodímeros de la proteína E2-E1 se cree que se relacionan con el proceso de fusión de membranas (El Omari et al., 2013) (Li & Modis, 2014). Es la proteína más importante para la generación de anticuerpos neutralizantes, la presencia de los cuales en los animales puede prevenir la infección.

#### 4.5.2 Proteínas no estructurales

Los *Pestivirus* codifican 8 proteínas no estructurales: la autoproteasa no estructural (N<sup>pro</sup>), la proteína P7 y las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (King, 2012).

La autoproteasa no estructural (proteína N<sup>pro</sup>) formada por 168 aminoácidos con un peso molecular de 23 kDa, es una autoproteasa que se cataliza un corte en los aminoácidos Cisteína-168 y Serina-193 liberándose a sí misma de la poliproteína resultante. Esta proteasa es importante para la replicación viral y el procesamiento de la poliproteína, se ha demostrado también que inhibe la inducción de interferón a través de una degradación de IRF-3 (por sus siglas en inglés Interferon Regulatory Factor 3) (Gottipati, Acholi, Ruggli, & Choi, 2014) en el proteosoma de la célula infectada (Aberle et al., 2014). Esta acción previene la apoptosis y la producción de Interferon (Jefferson et al., 2014).

La proteína no estructural p7 compuesta por aproximadamente de 60-70 aminoácidos con un peso molecular de 7 kDa, es una proteína integral de membrana con una estructura de hélice alfa, viroporina de clase II A (formadora de poros dependiente de los residuos 33-40 y 49 a 55), este dominio se inserta en las membranas de ER y Golgi y se cree que la función es de alcalinización del lumen del aparato de Golgi. se presume que tiene un rol en el proceso de desnudamiento del genoma y la producción de virus infeccioso, juega un rol

esencial en el ciclo de vida del pestivirus y contribuye a su patogenicidad (Gladue et al., 2012; Largo, Gladue, Huarte, Borca, & Nieva, 2014).

La proteína no estructural NS2-3 (120 kDa) (King, 2012) es una proteína multifuncional, importante y esencial en la producción de viriones infecciosos (Lattwein et al., 2012). Esta proteína se detecta después de la infección con todos los *Pestivirus* generalmente asociado a cepas no citopáticas (ncp). En células infectadas con *Pestivirus* citopáticos esta proteína es cortada en NS2 y NS3, donde grandes cantidades de NS3 pueden ser detectadas. Para cepas no citopáticas y cepas de CFSV, solo una pequeña fracción de NS2-3 (King, 2012). La NS2-3 tienen un papel esencial en la morfogénesis del virón (Klemens, Dubrau, & Tautz, 2015) . La proteína no estructural NS2 formada por 450 aminoácidos con un peso molecular de 40kDa, es hidrofóbica un 40% y contiene un motivo de unión de zinc el cual se une a metales iónicos divalentes (King, 2012). La NS2 es una cisteína-autoproteasa que es responsable por el procesamiento de NS2-3 para dar origen a NS2 y NS3 (Lattwein et al., 2012). La NS3 se ha caracterizado como una serinproteasa similar a la quimiotripsina de aproximadamente 80kDa (King, 2012) actúa como una proteasa involucrada en el procesamiento de poliproteínas (cortes entre NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Lattwein et al., 2012) y como una helicasa de ARN y una nucleótido trifosfatasa (NTPasa) involucrada en la replicación (Riedel et al., 2012). Para que NS3 tenga una actividad completa requiere NS4A como cofactor (Lattwein et al., 2012).

La proteína no estructural NS4A con un peso aproximado de 10 kDa (King, 2012) actúa como un cofactor de la actividad de NS3 como proteasa, y regula los pasos de escisión de la poliproteína viral (Lattwein et al., 2012). Por otro lado, para la proteína no estructural NS4B de 38 kDa en tamaño no se ha identificado totalmente la función que esta desempeña, sin embargo, podría estar involucrado en la replicación y patogénesis de los *pestivirus*. *Esta proteína* se localiza en las membranas intracelulares como una proteína de membrana integral y posee en su región C-terminal un dominio similar al receptor Toll/interleucina-1 que cuando se muta este sitio en cepas altamente virulentas, se ven atenuadas. Se ha identificado también que la región N-terminal de la proteína de BVDV y de VCFV puede actuar como modulador de la citopatogenicidad del virus y contribuye a la replicación del genoma (Tamura et al., 2015; Tamura et al., 2012).

La proteína no estructural NS5A se ha estudiado más en los virus de CSFV, la cual está formada por alrededor de 497 aminoácidos, de un tamaño aproximado de 58 kDa (King, 2012; Sheng et al., 2014), en este virus se ha descrito que desempeña un papel importante en la síntesis del ARN y puede jugar un rol importante en la regulación tanto del RNA viral como del RNAm celular. Se ha confirmado también que la parte C-terminal de esta proteína interactúa con la proteína C y esto está a su vez relacionado con la infectividad del virus y su capacidad de ensamblaje del virión (Tamura et al., 2012).

La proteína no estructural NS5B también se ha analizado mayormente en el virus CSFV, en el cual contiene un total de 718 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 77 kDa (King, 2012), es una ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp) que se encarga de la replicación del genoma del virus. Para llevar a cabo esta función necesita de la interacción con la proteína NS3 que actúa como una RNA helicasa y NTPasa y esta interacción es esencial para la replicación del genoma y su traducción (Tamura et al., 2012).

#### **4.6 Replicación de los Pestivirus**

La infección de *Pestivirus* es iniciada por una endocitosis mediada por receptores y con proteínas de recubrimiento como las clatrininas, involucrando receptores celulares como CD46 al cual se unen las glicoproteínas virales E1 y E2 (El Omari et al., 2013) (King, 2012; Zürcher, Sauter, Mathys, Wyss, & Schweizer, 2014).

Después de la endocitosis y desnudamiento del genoma, el ARN de polaridad positivo directamente es traducido por los ribosomas, en este proceso, el inicio de la traducción es independiente de cap ya que se involucra un IRES presente en la región 5'-UTR del ARN (Jefferson et al., 2014; King, 2012). El procesamiento de la poliproteína generada en esta traducción ocurre co y postraduccionalmente gracias a proteasas virales y celulares (Jefferson et al., 2014). Generando proteínas no estructurales, descritas anteriormente, necesarias para la replicación el virus y su ensamblaje.

Las Proteínas no estructurales como NS3, 4A, 4B, 5A y 5B son necesarias para la replicación del ARN; (Jefferson et al., 2014). La proteína NS5B es una ARN polimerasa dependiente de ARN que se encarga de la replicación del ARN viral (King, 2012). La formación de cadenas negativas de ARN en células se da entre las 10 y 12 horas post-infección (King, 2012), en este tiempo se inicia la replicación en sentido 3' con el fin de ser usadas como plantillas para la síntesis de cadenas positivas de RNA, lo cual coordina tanto la traducción como la replicación del RNA viral.

Tanto la maduración como el ensamblaje de viriones se inicia por medio de protusiones propias de la membrana del lumen del retículo endoplásmico, estas viriones se forman a partir de la nucleocápside y de envoltura lipídica con la proteína E2, es en este sitio donde inician las modificaciones postraduccionales de las proteínas Erns, E1 y E2 (glucosilación de tipo N y formación de puentes disulfuro), los viriones se acumulan en este organelo para luego trasladarse al aparato de Golgi y terminar su procesamiento y posteriormente ser liberados por exocitosis (Jefferson et al., 2014; Schmeiser et al., 2014). Las proteínas p7, NS2, NS3, NS4A y NS5B tienen un papel importante en el ensamblaje de viriones infectivos, pero según estudios de Liang y colaboradores no solo las proteínas no estructurales son útiles, sino también la proteína estructural E2. Esta última junto con la interacción de p7, se cree que participa en el ensamblaje de viriones de los *Pestivirus* reduciendo la acidificación de la vesícula intracelular para la producción de progenie infecciosa (Liang et al., 2009).

#### 4.7 Propiedades antigénicas

Los miembros de las distintas especies que forman el género *Pestivirus* están relacionados genéticamente y antigénicamente. Dentro de las proteínas contra las cuales se ha detectado anticuerpos circulantes en los rumiantes son mayormente anticuerpos contra la E2 y la E<sup>rns</sup> que forman parte de la envoltura. De estas la proteína E2 es la más antigénica y contra la cual se forman anticuerpos neutralizantes ya que posee dominios que permiten la interacción con los receptores celulares para la infección o penetración del virus (Abe et al., 2016). Los anticuerpos contra E<sup>rns</sup> aunque no son neutralizantes se han utilizado en el diagnóstico de algunas especies de pestivirus en vacunas marcadas, donde se utiliza la proteína recombinante E2 como vacuna y se detectan anticuerpos anti – E<sup>rns</sup> para diferenciar de aquellos producidos por infecciones naturales (Luo et al., 2013). También se producen anticuerpos contra las proteínas no estructurales, destacándose los anti-NS2-3, sin embargo, estos se producirán solo si se presenta una replicación del virus en el hospedero. Anticuerpos monoclonales contra E2, E<sup>rns</sup> y NS2-3 se utilizan para las distintas pruebas serológicas para el diagnóstico de infecciones por *pestivirus* (Vega, Rosell, Paton, & Orden, 2000).

## **4.8 Enfermedades causadas por Pestivirus en pequeños ruminantes**

### **4.8.1 Enfermedad de las Fronteras**

#### **4.8.1.1 Transmisión**

El Virus de la enfermedad de las Fronteras (BDV) puede ser transmitida horizontalmente entre animales infectados y susceptibles a través de diferentes formas o verticalmente (infección transplacentaria) (Tinsley, Lewis, & Brülisauer, 2012). El contacto directo con animales PI (persistentemente infectados) es la ruta más eficiente para mantener la infección en una población animal (King, 2012), así mismo, el PI puede contaminar con sus fluidos los sitios de estancia y así permitir la transmisión indirecta (Tinsley et al., 2012). La probabilidad de la transmisión por métodos indirectos depende del tiempo, temperatura, movimiento y dosis del virus, por ejemplo, en el semen de machos PI, inyectables contaminados o embriones contaminados (King, 2012; Tinsley et al., 2012).

La transmisión vertical es la causante de producir animales persistentemente infectados entre los 60 - 80 días de gestación (Cabezón et al., 2010; Fernández-Sirera et al., 2012; W. Li et al., 2013). Posterior a los 120 días de gestación las crías pueden nacer con anticuerpos (Fernández-Sirera et al., 2012).

#### **4.8.1.2 Manifestaciones clínicas**

El resultado de una infección con *Pestivirus* depende del estado inmunológico del animal principalmente, ya que los signos tienden a manifestarse en animales

mayores a 4 meses de edad al disminuir la inmunidad materna, o aquellas crías que nacen con problemas de un mal desarrollo fetal (Lanyon, Hill, Reichel, & Brownlie, 2014).

La enfermedad de las fronteras en ovinos y caprinos se caracteriza básicamente por manifestaciones de pirexias alrededor de 6 a 9 días post-infección, anorexia y lesiones en mucosas, enterorreas, temores, caquexia, alopecia, hiperpigmentación de piel y varios grados de alteraciones neurológicas, como: ataxia, debilidad y dificultad en el movimiento (Cabezón et al., 2011). Además de una conformación corporal anormal y pelo en la región de la dorsal y la cráneo esto último en el caso de animales pl (Li et al., 2013).

En las crías la infección es asociada con signología respiratoria y gastrointestinal (Yesilbag et al., 2014) como tos y enterorrea (Steffen et al., 2014). Pero estos síntomas también pueden ser el resultado de infecciones recurrentes o secundarias.

La signología en hembras se caracteriza con problemas reproductivos, entre los que destacan los abortos, crías que nacen muertas, hembras estériles, desordenes congénitos en corderos y caprinos existiendo debilidad en crías (Liu et al., 2013). Este tipo de virus en pequeños rumiantes al igual que en bovinos produce animales persistentemente infectados (Liu et al., 2013).

Entre las lesiones nerviosas se presentan en animales que padecieron infecciones durante la preñez, causando problemas en el desarrollo fetal entre las cuales se incluyen: hipoplasia cerebelar, porencefalia, hidrocefalia y meningoencefalomielitis con hipomielogénesis (Toplu, Oğuzoğlu, Epikmen, & Aydoğan, 2011).

Un gran porcentaje de ovejas postnatales infectadas presentan enfermedades subclínicas, pero pueden presentar signos medios o inaparentes en animales adultos. Estos pueden manifestar una viremia corta la cual acaba cuando los anticuerpos neutralizantes se desarrollan (Cabezón et al., 2011).

En infecciones postnatales de efecto medio, reportan signos como pirexia leve, con una linfopenia transitoria, lo cual luego sigue con una seroconversión (Fernández-Sirera et al., 2012). La signología entre ovejas y cabras puede ser similar, pero varía en ciertos aspectos, como las capas de pelaje más densas que son visibles en animales pl, además de problemas endocrinos como la aparición de hiperpigmentación en el abdomen, más presentes en ovinos por su susceptibilidad.

En el caso de machos adultos, una infección aguda puede ser asociada con una transitoria deficiencia en la calidad del semen. Hay indicaciones que el virus puede persistir y replicarse en tejido testicular por más de 6 meses, pero aun así

no puede ser aislado del semen. Además de esto puede ser transmitido por inseminación artificial con semen contaminado (Newcomer et al., 2013).

Los animales pl en ovejas se les conoce como “Hairy Shakers”, esto hace énfasis en la aparición de una capa de pelaje más densa en las áreas de la cabeza, parte inferior de la mandíbula y el dorso de los animales (Cabezón et al., 2011). Este es un síndrome de las mucosas causado por una superinfección descrito ocasionalmente en ovejas el cual tiende a presentar debilidad, depresión, caquexia enterorrea aguda y la muerte en un lapso de 5-14 días. Pero el grado de protección fetal contra retos heterólogos puede ser genotipo-dependientes (Lanyon, Hill, et al., 2014).

#### **4.8.1.3 Patogenia**

Se conoce que el virus se localiza en el tejido linfoide 4 a 10 días post-infección pero esto intermitentemente y a niveles bajos principalmente en macrófagos, linfocitos de tonsilas y en las placas de Peyer (Peterhans, Bachofen, Stalder, & Schweizer, 2010), las cuales constituyen las células blanco de la replicación viral, lo que genera una serie de factores inmunosupresores como la reducción de la quimiotaxis, supresión de las respuestas proliferativas de células mononucleares, alteración de la función neutrofílica, al nivel de disminuir su capacidad de degranulación, así mismo, decrece la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la liberación de un inhibidor de la actividad de las IL-1 (Peterhans et al., 2010), esenciales para el desarrollo normal y maduración de linfocitos.

Estos efectos, pueden facilitar el ingreso de otros microorganismos coinfectantes o aumentar la severidad de estos (Lanyon, Hill, et al., 2014).

Luego de la replicación en células linfocíticas, su diseminación se da por el torrente sanguíneo hacia otras células epiteliales, al llegar a estas células se promueve la activación y diferenciación de monocitos, pero al mismo tiempo crea una inhibición de la presentación del antígeno a células T. Esta inhibición causa una inflamación incontrolable que aumenta la viremia, la proteína NS3, se encarga de la inducción de apoptosis tanto intrínseca como extrínsecamente. Los cambios en las placas de Peyer causan atrofia y una disminución de linfoides, dando una apariencia de necrosis. En el estrato espinoso lleva a una interrupción en las uniones celulares de células epiteliales, esto casusa a la ruptura de las superficies epiteliales ocasionando erosiones y ulceraciones del tejido conectivo. En el caso de fetos, se da las lesiones teratogénicas incluyendo atrofia cerebelar, degeneración ocular, braquignatismo, formación de pseudoquistes en el cerebro, timo y retardo en el crecimiento óseo y pulmones, se da también vasculitis cerebelar, además de edema y necrosis de la lámina germinal; causando hidrocefalia e hipomielinización (Lanyon, Hill, et al., 2014).

#### ***4.8.1.3.1 Infección en hembras no preñadas***

En hembras no preñadas la infección es la mayoría de los casos subclínica, pero dependiendo del genotipo y la especie se puede producir una enfermedad severa donde los animales sucumben a la infección. El virus causa leucopenia y trombocitopenia (Newcomer et al., 2013) el grado y persistencia de estos

hallazgos hematológicos están asociados a la severidad de la infección así como el grado de viremia (Steffen et al., 2014).

#### **4.8.1.3.2 Infección en animales con inmunidad pasiva**

Terneros o corderos que reciben calostro con anticuerpos de *Pestivirus*, alcanzan una inmunidad pasiva que los protege de infecciones durante el primer mes de vida (King, 2012). Los anticuerpos maternos son detectables unas horas después de la primera ingestión y declinan a una tasa de la mitad de los títulos de anticuerpos restantes cada 21 días. La duración de esta protección depende de la concentración de anticuerpos neutralizantes en el calostro, la cantidad ingerida y también posiblemente por la exposición del cabrito y cordero. Los anticuerpos pasivos pueden detectarse por 4-6 meses (King, 2012). En el caso de animales pl los anticuerpos maternos declinan a un nivel más rápido. La vacunación interfiere con la inmunidad pasiva en el caso de los bovinos (Ellis, West, Cortese, Konoby, & Weigel, 2001). Demostraron que la vacunación antes de una disminución de anticuerpos maternos no protege contra la infección de BVDV tipo II. En otro estudio realizado por (Brar, Johnson, Muscoplat, Shope, & Meiske, 1978) demostró que los terneros no respondían serológicamente a la vacuna hasta que los anticuerpos maternos hayan disminuido esto dándose luego de 200 días, ambos experimentos fueron realizados en bovinos, debido a la existencia de vacuna en esta especie.

#### ***4.8.1.3.3 Infección en hembras preñadas***

El virus muestra afinidad por células con división rápida, y un feto en desarrollo es un sitio favorable para la replicación. En hembras preñadas no inmunes el virus infecta el feto (Passler et al., 2014). Aun así, la ruta exacta de como el virus alcanza el feto no es clara, así como la secuencia de tiempo para la infección de diferentes tejidos.

El resultado específico de la infección viral depende de la etapa de gestación, (Bachofen et al., 2014). Por lo que se puede presentar fallas al momento de concepción, el nacimiento de terneros persistentemente infectados (pl), (Bachofen, Bollinger, Peterhans, Stalder, & Schweizer, 2013) malformaciones, muerte fetal, abortos, (O'Sullivan et al., 2011) momificaciones, retardo en el crecimiento intrauterino y terneros muertos o débiles (O'Sullivan et al., 2011). Los abortos pueden aparecer en cualquier momento de la preñez y no están asociados con el tiempo de infección.

#### ***4.8.1.3.4 Animales persistentemente infectados***

Las infecciones en el 50-63 día de gestación, antes que el feto desarrolle su sistema inmune, puede resultar en una infección persistente, en el caso de pequeños rumiantes (Bachofen, Bollinger, et al., 2013; Bachofen et al., 2014). Estos animales pl son los transmisores claves de la infección, debido a que producen y descargan grandes cantidades del virus en todo tipo de fluidos

corporales (Bachofen, Bollinger, et al., 2013). Típicamente los animales pl no desarrollan una respuesta de anticuerpos al virus, hasta el paso de la inmunidad maternal, pero si son expuestos a cepas heterólogas estas producirán anticuerpos neutralizantes (King, 2012). Estos a su vez pueden afectar la habilidad para aislar virus de dichos animales. Animales pl tienden a ser inmunodeprimidos o inmunosuprimidos, siendo susceptibles a otras enfermedades (Bachofen et al., 2014). Esta razón es la causante que estos animales mueran o sean sacrificados antes de la edad adulta, a pesar de esto los animales pueden ser sanos clínicamente (Byers et al., 2011).

Las hembras que son pl que llegan a la edad adulta pueden concebir, de esta manera la infección es transmitida a fetos siendo esta descendencia de animales pl (Byers et al., 2011).

#### **4.9 Otras Infecciones por *Pestivirus* en pequeños rumiantes.**

La signología de BVDV reportada en ovinos y caprinos es caracterizada por manifestaciones reproductivas principalmente como muertes fetales, abortos o la aparición de animales pl, pirexia, diacriorrea (Bauermann, Falkenberg, Decaro, Flores, & Ridpath, 2015), además de casos de enterorrea, pero reportes de caprinos con ausencia de problemas reproductivos son raros. También se presentan casos de bronconeumonía debido a inmunosupresión, causando al

mismo tiempo casos de enteritis y serositis. En el caso de cerdos las infecciones por CSFV se caracterizan por caquexia, hemorragias, leucopenia (Tao et al., 2013) y úlceras gastrointestinales, variando en su severidad, además de su ubicación que pueden ser tanto en extremidades como mucosidades orales (Nelson, Duprau, Wolff, & Evermann, 2016). En el caso de ser infecciones por BVDV no existen signos aparentes, pero al ser otro tipo de pestivirus a CSFV se asocian al igual que pequeños rumiantes a problemas reproductivos, pero se reportan signos como hipertermia y cólicos, en el caso de lechones se describe anemia, pelo hirsuto, retardo en el crecimiento, temores, conjuntivitis, diarrea, poliartritis, petequias en piel y cianosis en las puntas de las orejas. (Tao et al., 2013)

#### **4.10 Diagnóstico de enfermedades causadas por *Pestivirus*.**

El diagnóstico de las enfermedades causadas por los *Pestivirus* es uno de los ejes centrales en los programas de control y erradicación de las mismas. A nivel internacional la OIE en su manual para el diagnóstico de la enfermedad de los animales terrestres establece la normativa internacional para el diagnóstico de las enfermedades causadas por las distintas especies de *Pestivirus* (Stewart, 2012), así como también los propios países establecen normas zoonositarias nacionales para este mismo propósito.

Para el caso de los *pestivirus* la prueba de oro para su diagnóstico es el aislamiento viral que se confirma con pruebas como inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa con anticuerpos específicos anti-pestivirus (Stewart, 2012). La detección indirecta de la infección por miembros de este género se da a través de la respuesta inmune que estos generan en el huésped produciendo anticuerpos anti-pestivirus a través de seroneutralización y pruebas de ELISAS, principalmente. (Stewart, 2012) Las pruebas moleculares en las últimas décadas han permitido detectar fragmentos de los ácidos nucleicos en los fluidos y tejidos corporales de los animales con infecciones con sintomatología sugerentes de esta infección a través de la Reversa Transcriptasa-Reacción en Cadena de la Polimerasas en su modalidad de punto final o tiempo real. Así como también, la observación de viriones en muestras con o sin uso de inmunomarcaje a través del microscopio electrónico (Stewart, 2012).

#### 4.10.1 Aislamiento Viral

El aislamiento viral se realiza de acuerdo al diagnóstico y la especie animal de la cual proviene, en diferentes líneas celulares (MDBK, SFT-R, BEL 26, ente otras) y en distintos tiempos de incubación. De los animales vivos, se puede hacer el aislamiento de estos *pestivirus* a partir de diferentes muestras, entre las cuales se encuentra el suero, a partir de capa leucocitaria, muestras de leche, heces, muestras de descargas nasales, muestras de descargas vaginales y por supuesto muestras de distintos tejidos a la necropsia, según el síndrome en el

que participa el virus (respiratorio, digestivo o reproductivo) (Rümenapf & Thiel, 2008). Estas muestras se procesan acorde a los protocolos de diagnóstico de la OIE para estos virus y finalmente se filtran por una membrana con tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ . (Rümenapf & Thiel, 2008)

Si las células son permisivas (es decir pueden ser infectadas por el virus) el virus se replicará en las siguientes 24-48 horas postinfección. La replicación del virus causará ciertos efectos en la célula que podrán o no ser visibles al microscopio óptico. (Rümenapf & Thiel, 2008)

De acuerdo al efecto que el virus produce en las células existen dos biotipos. Las cepas citopáticas (cp) que desencadenan la apoptosis en las células infectadas causando un efecto citopático (CPE) (Fig. 1 y 2) y las cepas no citopáticas (ncp) que inhiben la apoptosis en células infectadas y estas se observan aparentemente normales (Rümenapf & Thiel, 2008). Los viriones producidos en la infección se secretan al medio de cultivo pudiendo así infectar otras células. Mayor dosis infectiva con virus cp, mayor CPE en la monocapa celular por lo que el periodo de incubación varía acorde a carga viral de la muestra y patogenicidad de la misma para este biotipo. Los biotipos no citopáticos son un contaminante frecuente de uno de los principales insumos de cultivo celular que es el suero fetal bovino. Estos virus pasan y sobreviven a los métodos de esterilización (filtración e irradiación) por lo que es importante comprobar con pruebas regulares que tanto los sueros usados como los cultivos celulares están libres de

virus, ya que la replicación del mismo altera el metabolismo celular, lo que podría generar resultados no confiables (OIE, 2012).

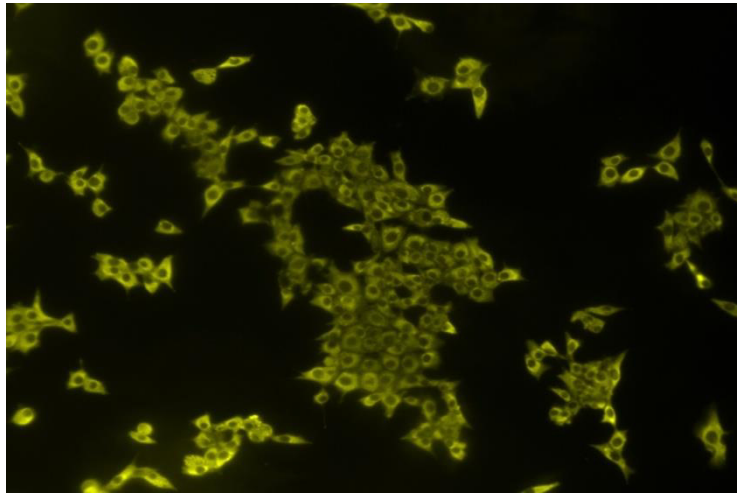
Independientemente del biotipo se debe realizar una prueba confirmatoria para demostrar el aislamiento del virus, ya que las cepas ncp no causan efecto sobre la monocapa celular y el efecto CPE causado por los virus ncp no es exclusivo de este virus. Las pruebas confirmatorias que se realizan a partir de la monocapa del cultivo son la inmunofluorescencia indirecta, la inmunoperoxidasa indirecta o directa y a partir de la monocapa el sobrenadante una RT-PCR (OIE, 2012). Los sobrenadantes de estos cultivos positivos se guardan a -70°C para su posterior utilización en otras técnicas (OIE, 2012).

Las desventajas de esta técnica son el alto costo para la implementación de un laboratorio, personal altamente capacitado y el tiempo de incubación de la muestra tardándose hasta una semana para la obtención de los resultados. Las ventajas es la prueba con mayor sensibilidad para el diagnóstico de pestivirus, siendo esta la prueba de oro (OIE, 2012).

#### 4.10.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en cultivo celular

Es una prueba simple, rápida y altamente sensible, detecta principalmente proteínas como NS2-3 y E2 utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales específicos que están dirigidos contra la proteína a detectar. Los anticuerpos más usados son los monoclonales específicos contra *Pestivirus*, producidos de hibridomas murinos utilizándose un anticuerpo anti-ratón marcado con

fluorocromos (FITC, CY3, entre otros) evidenciando la interacción monoclonal-proteína de *BVDV* (OIE, 2012). Resultados positivos se observan cuando dentro del cultivo una célula posee fluorescencia en su citoplasma (Figura 1).



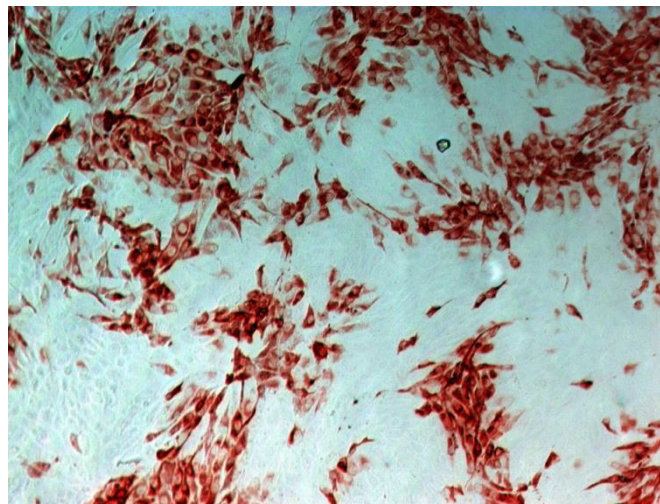
**Figura 1. Inmunofluorescencia Indirecta de una infección por Pestivirus en células MDBK.**

Monocapa celular con confluencia del 80% fueron infectadas con la cepa cp NADL-BVDV1, después de 48 horas postinfección fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo monoclonal anti-NS3 y un segundo anticuerpo cabra anti-ratón marcado con Cy3. La fluorescencia se puede observar en el citoplasma de las células infectadas. Fotografía cortesía de *Cedillo-Rosales S.*

#### 4.10.3 Inmunoperoxidasa indirecta en cultivo celular

Es una prueba de inmunodetección rápida, detecta antígenos virales cuando existe una replicación viral en cultivos celulares. Es una prueba similar a inmunofluorescencia, sin embargo, en este test se utiliza un anticuerpo monoclonal o policlonal (IPO directa) o un anticuerpo anti especie (IPO indirecta) marcado ligado a la enzima peroxidasa (PO). El montaje de la técnica es similar

a la IFI, sin embargo, aquí se agrega además un sustrato que es degradado por la PO permitiendo un cambio en la coloración de muestras positivas. La lectura se realiza mediante un microscopio invertido de campo claro observando un precipitado de color oscuro en el citoplasma de la célula infectada (OIE, 2012). Ambas pruebas son muy específicas y con alta sensibilidad, las desventajas son que se requiere de una infraestructura costosa y alta capacitación técnica.



**Figura 2. Inmunoperoxidasa Indirecta de una infección por Pestivirus en células MDBK.**

Monocapa celular con confluencia del 80% fueron infectadas con la cepa cp NADL-BVDV1, después de 48 horas postinfección fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo monoclonal anti-NS3 y proteína G-*Porque* degradado un sustrato. Las presencias de precipitado color rojizo en el citoplasma celular indican infección viral en las células. *Fotografía cortesía de Cedillo-Rosales S*

#### 4.10.4 Ensayos de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISAS)

La ELISA (de sus siglas en inglés “*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*”) es la técnica frecuentemente más usada para la detección de anticuerpos o antígenos

en muestras de suero, sangre completa y leche (Eiras, Arnaiz, Sanjuán, Yus, & Diéguez, 2012). Utiliza el concepto de la unión de un antígeno a su anticuerpo específico, lo cual ayuda en la detección de cantidades muy pequeñas de proteínas o anticuerpos en muestras de fluidos. Este complejo inmune es evidenciado por una enzima peroxidasa unida a un anticuerpo que degrada un sustrato indicando la presencia del complejo inmune. Este tipo de pruebas puede ser cuantitativa o cualitativamente. Existen dos tipos aquellas que detectan anticuerpos y las que detectan antígenos.

#### **4.10.4.1 ELISA para la detección anticuerpos contra los Pestivirus**

Existen varios formatos de ELISAS para la detección de anticuerpos, los más usados para la detección de anticuerpos contra *pestivirus* son los ELISA indirectos y el ELISA de competencia.

En la ELISA indirecta, un antígeno se liga a la fase sólida (una microplaca de 96 pozos), el cual captura los anticuerpos presentes en la muestra. Posteriormente se evidencia esta unión con un anti-especie marcado con peroxidasa, la cual a su vez degrada un sustrato y el resultado se lee por la medición en un espectrofotómetro de la coloración resultante (Densidad óptica (OD)), donde a mayor OD, mayor cantidad de anticuerpos de la muestra capturada, mayor cantidad de anticuerpos anti-especie marcados con PO y mayor sustrato degradado (OIE, 2012). Para la detección de anticuerpos para Pestivirus existen estuches comerciales de ELISA para la detección de anticuerpos anti-p80/NS3,

se utilizan en el diagnóstico para infecciones naturales o aquellas originados por vacunas inactivadas utilizando como muestras, suero, plasma y leche (Eiras et al., 2012).

En las ELISAS de competencia para la detección de anticuerpos se utilizan dos tipos de fases, una ELISA Sandwich donde se fijan a la placa anticuerpos de captura de un antígeno y un antígeno fijado a este, lo que permite la captura de los anticuerpos de la muestra (suero, plasma), posteriormente se agrega un anticuerpo contra el antígeno capturado y marcado con PO y un sustrato por degradar. Si existen anticuerpos en la muestra se ocuparán los sitios en los antígenos y el anticuerpo marcado con PO no se une por lo que, a mayor título de anticuerpos, menor OD en la lectura. En el caso contrario, si no existen anticuerpos en la muestra los sitios en los antígenos son ocupados por el anticuerpo marcado con PO y tendrá una mayor OD. En algunas ELISAS por competencias los antígenos son directamente fijados al pocillo de la placa y el resto del concepto es similar al ya descrito arriba. Las ELISAS de este tipo que detectan anticuerpos anti-pestivirus son diseñadas principalmente contra NS3 (OIE, 2012).

#### **4.10.4.2 ELISA para la detección de antígeno de *Pestivirus***

Las ELISAS que detectan antígenos tienen un modelo de captura o de tipo sándwich. Donde el estuche comercial utiliza para la captura del antígeno un anticuerpo que se fija en los pocillos de la microplaca de titulación. La muestra

(plasma, suero, leche, entre otros) que posee el antígeno (proteína o viriones) son capturados por este anticuerpo, posteriormente esta unión se evidencia con la unión de un anticuerpo contra el antígeno marcado con PO y la degradación de un sustrato. A mayor antígeno fijado, mayor anticuerpo-PO fijado, mayor degradación de sustrato y mayor OD. En muestras negativas no se adhiere antígeno, por lo tanto, tampoco anticuerpo-PO y abra una menor OD. Existen ELISAS de captura de antígeno para Pestivirus basadas en la proteína Erns y E2, así como de NS3.

La sensibilidad y especificidad de este tipo de pruebas es menor al aislamiento viral. Sin embargo, el tipo de equipo y la capacitación de los técnicos no son tan exigentes como en el aislamiento celular. Otra ventaja es el alto número de muestras que se pueden procesar y la rapidez con que se obtienen los resultados (pocas horas) comparada con días que se requiere para el aislamiento.

#### 4.10.5 Métodos moleculares para el diagnóstico de infecciones por Pestivirus

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* amplificando millones de veces una secuencia específica de ADN o RNA durante varios ciclos repetidos, en donde la secuencia blanca es copiada exactamente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células. En la reacción el segmento a amplificar proviene de una muestra de ADN (genómico, extra

cromosómico o viral). Cuando el ácido nucleico es de tipo ARN (celular o viral) se utiliza un paso adicional al PCR donde una enzima transcriptasa reversa o retrotranscriptasa que produce una cadena complementaria de ADN (ADNc), a partir del cual posteriormente se realizará un PCR, denominando a esta técnica Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Los elementos importantes son el DNA o cDNA purificado, la enzima ADN-polimerasas, oligonucleótidos, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), el cloruro de magnesio, buffer y agua. En proceso se lleva a cabo en ciclos que comprenden un paso de desnaturalización de la molécula de ADN, un paso en la alineación de los oligonucleótidos y un paso de extensión o formación de las nuevas cadenas del ADN.

En el caso de los *Pestivirus* como poseen un genoma de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva el método que se utiliza para su diagnóstico es el RT-PCR a partir de distintas áreas del genoma de los pestivirus, aunque la mayoría de los segmentos seleccionados se encuentran en las regiones más conservadas que es la 5'UTR (OIE, 2012). Esto puede tener un valor especial cuando se sospecha contaminación vírica de bajo nivel, por ejemplo, en animales con poca carga viral o en productos biológicos tales como vacunas y suero fetales utilizado en el cultivo celular (OIE, 2012).

Se necesita precaución en la interpretación de los resultados, ya que la detección de ARN vírico no implica *per sé* que el virus infeccioso esté presente (OIE, 2012).

El PCR de tiempo real tiene como objetivo detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de fluorocromos en la reacción en tiempo real, es decir, la amplificación se detecta en cada ciclo de amplificación. Esta técnica se puede usar también para detectar el ARN viral, mensajero o de otro tipo, para lo cual se realiza RT-PCR en tiempo real. Con esta metodología se puede utilizar para realizar la cuantificación relativa o absoluta de las moléculas presentes en la muestra, usando una curva conocida de calibración y controles endógenos para establecer este parámetro (OIE, 2012).

#### **4.11 Programas de control y erradicación de pestivirus en pequeños rumiantes.**

Los programas de control y erradicación de pestivirus para el caso de BVDV y BDV toman en cuenta en primer lugar que no son estrictos a una especie en particular, además de que BVDV puede transmitirse a ganado proveniente de especies que no son consideradas como especies primarias del virus. Se considera que un 23% de ovinos y 15% de caprinos se encontraron con anticuerpo contra BVDV, además se encontró que la infección de BVDV se da en más de 50 especies de vida salvaje (Passler & Walz, 2010).

La frecuencia de transmisión se da por la prevalencia de animales pl y de anticuerpos de pestivirus en pequeños rumiantes y en especies de vida silvestre, además del tamaño de las poblaciones, siendo importante ya que las poblaciones

de ovinos, caprinos y rumiantes de vida salvaje; al ser de menor tamaño que las poblaciones de bovinos en el mundo, tienden a diseminarse más rápido. (Schweizer & Peterhans, 2014)

Hay que tomar en cuenta que la información acerca de animales pl en pequeños rumiantes y de vida silvestre no se toma como referencia, causando el desconocimiento de reinfecciones por BVDV en estas especies. Los programas de erradicación en Escandinavia y Europa, no encuentran como un factor de riesgo la transmisión de estos virus a partir de especies secundarias. Sin embargo, aun sin saber de estas nuevas cadenas de infecciones en las poblaciones de ovicaprinos y rumiantes de vida silvestre, las infecciones esporádicas complican los programas de erradicación. Para tratar con estas dudas, además de diagnósticos positivos en rumiantes en general; es necesario realizar investigaciones costosas, analizando la especificidad de anticuerpos detectados y sondeo de animales en las áreas afectadas por virus. (Schweizer & Peterhans, 2014)

La importancia económica de los *Pestivirus* es clara, pero su control está lejos de ser satisfactoria. Los programas de control y erradicación que se han establecido para controlar Pestivirus han sido contra las especies BVDV en bovinos y CSFV en cerdos. El mayor objetivo de los controles es el prevenir la ocurrencia de animales persistentemente infectos en el rebaño. Esto requiere la identificación por múltiples pruebas diagnósticas como: el aislamiento viral (VI por sus siglas en inglés "Virus Isolation"), ELISA, inmunohistoquímica, y RT-PCR (Corbett,

Grooms, Bolin, Bartlett, & Grotelueschen, 2011), la eliminación de dichos animales (VanderLey, Ridpath, & Sweiger, 2011), y evitar la introducción de animales enfermos por medio de cuarentenas.

#### **4.12 Epidemiología de los *Pestivirus* en ovejas y caprinos**

Como se ha señalado anteriormente los ovinos y caprinos pueden ser infectados por BDV, BVDV-1, BVDV-2 y CSFV. Por lo que son importantes reservorios junto con algunos rumiantes silvestres de estos pestivirus, sobre todo en aquellas unidades de producción donde se mezclan estas especies productivas (ovicaprinos y bovinos), ovicaprinos y cerdos (Schweizer & Peterhans, 2014). Tanto BVDV como CSFV son dos virus en la que se han implementado programas de control y erradicación obligatorios en países europeos como Alemania y países escandinavos, donde las especies ovinas, caprinas y otros rumiantes silvestres pueden ser reservorios para estos virus (Schweizer & Peterhans, 2014). En realidad, existen pocos estudios publicados sobre prevalencia, así como estudios de la patogenie de los pestivirus en pequeños ruminates y se describen a continuación.

La distribución del Virus de la Enfermedad de las Fronteras (BDV) es mundial, pero la verdadera seroprevalencia de la misma entre los países y las regiones es poco conocida debido a que existen pocos estudios (Li et al., 2013). Mientras que la seroprevalencia mundial puede oscilar entre 1-100%, con un promedio de 27.5%. Existen reportes australianos los cuales indican prevalencias de 31.3% o

inclusive hasta un 82% (Lanyon & Reichel, 2014). Por otro lado, pocos estudios han estimado la verdadera prevalencia de BDV reportan porcentajes como 0.68% de BDV en unidades de producción ovina en Suiza (Braun, Bachofen, Schenk, Hassig, & Peterhans, 2013), en Austria de un 0.32% (Krametter-Froetscher et al., 2007), en Turquía de un 2% (Oguzoglu et al., 2009) y España un máximo de 0.6% (Valdazo-González, Alvarez-Martinez, & Greiser-Wilke, 2006).

Estudios realizados en ganado ovino Inglaterra y Gales detectaron la presencia de anticuerpos utilizando antígeno de BVDV mediante inmunodifusión en un 10.8 % de un total de 3506 individuos muestreados encontrando diferencias de seroprevalencia entre las distintas regiones geográficas. Por otro lado un muestreo de cuatro años en Escocia con un total de 1231 brotes en bovinos y 682 brotes en ovinos de abortos arrojo que el 26% de estos brotes eran debidos a *Pestivirus* (Snodgrass, Herring, Reid, Scott, & Gray, 1980),

Czopowicz y colaboradores realizaron un estudio en el 2007 en unidades de producción de pie de cría de caprinos en Polonia (49 hatos- 1060 muestras) para las que encontró una seroprevalencia de 10.2% para pestivirus. Estudios de seroneutralización pudieron identificar a BVDV-1 en 7 de los ocho casos detectados y no se pudo identificar la especie de otro caso (Czopowicz et al., 2011)

En el estado de Carinthia, Austria se realizó un estudio en 147 hatos caprinos (1527 muestras) para determinar la seroprevalencia a través de ELISA y SN encontrando un 47.6% por hato y una prevalencia individual de 16.3% donde se

vio una influencia por las variaciones geográficas en la misma. La región geográfica con más seroprevalencia de hato (69.7%) e individual (25.9%) fue la región de Spittal/Drau, siendo más alta en unidades de producción donde había vacas y ovejas (Schleiner, Metter-Frotscher, et al., 2006). Al realizar la seroneutralización contra un virus de BVDV-1/NADL, BVDV-2/Strain 125, BDV/Moredun, se pudo detectar un 28% (70/249) con un título más alto para BVDV, un 10% (10/240) para BDV, en el resto de las muestras positivas no se pudo determinar por SN la especie debido a la intensa reacción cruzada de que se observó en estos ensayos (Schleiner, Krametter-Frotscher, et al., 2006).

Así mismo, Braun y colaboradores determinaron que el compartir pasturas comunales en los Alpes entre ovinos y bovinos es un factor de riesgo en la transmisión de BDV a estos segundos. Para el estudio se analizaron 1170 ovinos y 923 bovinos, utilizando RT-PCR en la primera especie y ELISA de anticuerpos para la segunda, antes de introducirlos en las zonas comunes de pastoreo y después del periodo de pastoreo. Se pudo detectar la presencia de 8 ovejas virémicas para BDV en una de las zonas de pastoreo. Además, se encontró que el 26% (99 de 380) de los animales que al ingresar al pastoreo eran negativos seroconvirtieron y el 70% (70/99) de los mismo era del área donde se encontraron a las ovejas virémicas. Además, se confirmó una infección por BDV a través de SN en 10 bovinos y se sospechó en 8, estableciendo así el salto entre especie de BDV de ovejas a bovinos. Así como la confirmación de 8 bovinos infectados

con BVDV y tres sospechosos (Braun, Bachofen, Buchi, Hassig, & Peterhans, 2013).

Un estudio realizado en unidades de producción donde se mezclan bovinos y ovinos en el este de Suiza obtuvieron una seroprevalencia general contra pestivirus del 18.7%. El 13.5% (310/2291), seroprevalencia en ovinos fue muy amplio (0-73.9%). Así mismo se determinó con SN la especificidad de los anticuerpos dando como resultado que en 6 unidades de producción en título de anticuerpos fue más alto contra BVDV y en 3 unidades de producción los títulos más altos fueron contra BDV. Encontrando que la seroprevalencia en Ovejas de BVDV era mayor cuando se encontraban en el mismo establo vacas y ovejas y no así la seroprevalencia de BDV (Braun, Bachofen, Schenk, et al., 2013).

Por otro lado, investigaciones realizadas por Martin y colaboradores en rumiantes silvestres y domésticos que comparten las mismas pastas en la región de Hautes en los Alpes franceses encontró una seroprevalencia general para pestivirus de 45.9% en rebeco, gamuza, sarrío o ante (*Rupicapra rupicapra*) y un 61.1% en muflones (*Ovis gmelinii musimon*), utilizando SN se determinó la especie de BDV (Claire Martin et al., 2011). En otro estudio realizado en la misma región se analizaron 38 hatos domésticos (1383 ovinos) y un total de 160 rumiantes silvestres y se determinó que todos los hatos tenían animales seropositivos, con una seroprevalencia individual de 76.5% en ovinos, y un 38.7% de seroprevalencia en rumiantes silvestres (28.7% de rebecos, 22.5% de los corzos (*Capreolus capreolus*) y 100% de los muflones). 3 pestivirus fueron aislado y

caracterizados a partir de las muestras positivas a RT-PCR de rumiantes silvestres, que se caracterizaron como BDV-3, BDV-Tunisian y BDV-6 (3/160) lo que sugiere el salto interespecie entre rumiantes silvestres y domésticos (Martin et al., 2015).

Estudios realizados en España para detectar seroprevalencia entre rumiantes silvestres y rumiantes domésticos (bovinos y ovinos) encontraron una seropositividad a *Pestivirus* de 0.1% en corsos, 23.2% en bovinos y un 10.8% en ovinos. Al realizar una diferenciación en la respuesta inmune mediante SN se detectaron contra BVDV, BDV genotipos 1,4y 5, encontrando especialmente en un bovino mayor título para BDV-4, estableciendo salto interespecie de este virus (Paniagua et al., 2016). Otros estudios retrospectivos realizado en los Pirineos en España en rebecos, muflones, ciervos rojos o europeos (*Cervus elaphus*), corzos (*Capreolus capreolus*) y gamo común o europeo (*Dama dama*) arrojaron un 16.5% de seropositividad a pestivirus, donde la especie con mayor seroprevalencia fueron los rebecos con un 48.6%, además se detectaron dos animales positivos para antígeno y genoma agrupando a esta variante como BDV-4 (Marco et al., 2011).

Por otro lado, Postel y colaboradores demostraron un alto título de anticuerpos contra CSFV en un estudio realizado en 2004-2007 con 1,036 muestras de cabras y ovejas en Turquía con una ELISA que detectaba anticuerpos específicos para CSFV, dichos títulos se presentaron en 11 muestras tomadas de 7 unidades de producción ovina. Posteriores estudios de SN con cepas específicas para BDV

y CSFV y análisis filogenéticos de los mismos encontraron que estas cepas de pestivirus estaban más estrechamente relacionadas con CSFV (Postel et al., 2015).

En Nueva Zelanda no se han realizado muchos estudios a pesar de su alta producción ovina, sin embargo, se ha podido tipificar aislados virales recolectados de 1967-1997, obteniendo generalmente BVDV-1 en poblaciones bovinas y BDV de ovejas (Vilcek, Bjorklund, Horner, Meers, & Belak, 1998), además se han detectado un toro semental infectado persistentemente con BDV (McFadden et al., 2012).

En Egipto se realizó un estudio en cabras para caracterizar pestivirus de dos cabras recién nacidas mediante aislamiento y secuenciación del virus caracterizándolo como BDVD-1b (Abdel-Latif et al., 2013), Por otro lado, estudios en la India se ha encontrado la presencia de BVDV-1, BVDV2 tanto en cabras como ovejas y BDV-1, BDV-5 y BDV-7 en ovejas (Mishra et al., 2016a).

En países del continente americano existen bastantes estudios relacionados con BVDV en poblaciones bovinas, sin embargo, la presencia de pestivirus en pequeños rumiantes es escasa. En Sudamérica se han detectado pestivirus en otras especies de rumiantes como llamas (*Lama glama*) y alpacas (*Vicugna pacos*) (BVDV 1b y BVDV1j) (Aguirre, Fuentes, & Celedón, 2014), en Argentina se ha reportado en ovejas que pastan con bovinos (BVDV-1<sup>a</sup>) (Juliá, Craig, Jiménez, Pinto, & Weber, 2009). Por otro lado, en México existen escaso datos sobre la presencia de pestivirus en rumiantes, especialmente en ovejas y cabras.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL

#### 5.1.1 Equipos

- ❖ Campana de flujo LABCONCO® Purifier class II Biosafety Cabinet (Delta series).
- ❖ Incubadora O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> MCO-18AIC (UV) SANYO®.
- ❖ Centrífuga refrigerada BIOMETRIX® MICRO 17TR.
- ❖ Microscopio óptico invertido AXIOVET 40C ZEISS®.
- ❖ Refrigerador de 16 pies cúbicos 2-4 °C TORREY.
- ❖ Ultra congeladores de -20 °C CFC0735 ARW, ADMIRA.
- ❖ Ultra congelador de -80 °C MDF-C8V1, Sanyo Scientific.
- ❖ Ultra congelador de 150 °C MDF-C2156VANC, Sanyo Scientific.
- ❖ Micropipetas Bio/Pet (1000/100 µl); (200/20 µl); (100/10µl); (10/0,5 µl).
- ❖ Tubos de polipropileno de microcentrífuga MCT-150-C.
- ❖ Lector de Elisás ELx800; BIOTEK.
- ❖ Termociclador, MAXYGENE; AXYGEN.
- ❖ Incubadora E-33, RIOSSA DIGITAL.
- ❖ Simplicity® UV; F9AN46648; MILLIPORE.
- ❖ Cámara Transiluminadora UVP; UV, MultiDoc-It; Digital Imaging System.
- ❖ Bloque térmico (55-60 °C) AccuBlock, Labnet International.

- ❖ Puntillas desechables para micropipetas de 10, TF-300-R-S, AXYGEN 20, 200 T-200-Y, AXYGEN, 1000 T-1000-B, AXYGEN SCIENTIFIC µl.
- ❖ Vórtex; Daigger; Genie 2.

#### 5.1.2 Material biológico

- ❖ Suero de caprinos y ovinos domésticos facilitados por los propietarios de distintas UPP en el estado de Nuevo León.
- ❖ Cepa del virus de Diarrea Viral Bovina tipo 1: BVDV-1/NADL (ATCC: VR-534) proporcionado por el Laboratorio Central Regional de Monterrey, A.C. de la UGRNL.
- ❖ Anticuerpo monoclonal para la detección de *Pestivirus*.

#### 5.1.3 Estuches comerciales.

- ❖ INgezim BVD compac® 5 placas NEOGEN Latinoamérica.
  - Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras.
  - Viales conteniendo suero Control Positivo.
  - Viales conteniendo suero Control Negativo.
  - Viales conteniendo conjugado (AcM anti p-80/p125) de peroxidasa concentrado 100x.
  - Frascos con solución de lavado concentrada 25x.
  - Frascos conteniendo diluyente (DE01-01).
  - Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso.
  - Frascos conteniendo solución de frenado.

- ❖ Access RT-PCR System (Promega®)
  - Agua libre de nucleasas (volumen final de 50µl) Xµl.
  - AMV/*Tfl* 5X buffer de reacción 10µl (1X).
  - dNTP Mix (10mM cada dNTP) (1µl 0.2mM).
  - Primer forward, 50pmol (1µM).
  - Primer reverse 50pmol (1µM).
  - 25mM MgSO<sub>4</sub> 2µl (1mM).
  - AMV Transcriptasa reversa (5u/µl), 1µl (0.1u/µl).
  - *Tfl* DNA Polimerasa (5u/µl) 1µl (0.1u/µl).
  - RNA muestra o control Yµl; volumen final 50µl.

#### 5.1.4 Reactivos

- ❖ Cloroformo al 99.8%, Jalmek®.
- ❖ Alcohol isopropílico 99.5%, Jalmek®.
- ❖ Etanol Anhidro 99.5%, Jalmek®.
- ❖ Agua libre de RNAsas y RNAsas, tratada con DEPC (Diethylpyrocarbonato); RESEARCH ORGANICS Inc.
- ❖ Agua ddPCR: H<sub>2</sub>O doblemente desionizada (bidestilada) y esterilizada en autoclave para RT-PCR.
- ❖ Solución de agarosa, Agarosa LE, AGR-LE-500 ASYGEN BIOSCIENCES: 1,5 % (w/v) en Buffer SB1X.
- ❖ Buffer de corrimiento para ADN/ARN: SB 1X.
- ❖ Marcador de peso molecular 500 µl. 100 bp ADN, GenScript.

- ❖ Buffer SB 1X (50 ml. Buffer 20X, 35 gr. Ácido bórico (F.W. 61.83) y 6 gr. De NaOH (F.W. 61.83), 1 litro de agua destilada, pH 8, estéril) y 950 ml. Agua destilada y esterilizada (buffer de electroforesis).

## **5.2 METODOLOGÍA**

### *5.2.1 Lugar y Procesamiento de las Muestras*

El procesamiento de las muestras de este estudio se llevó a cabo en el Departamento de Virología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, así como en el laboratorio de cultivo de células del Laboratorio Central Regional de la Unión Ganadera Regional del Estado de Nuevo León.

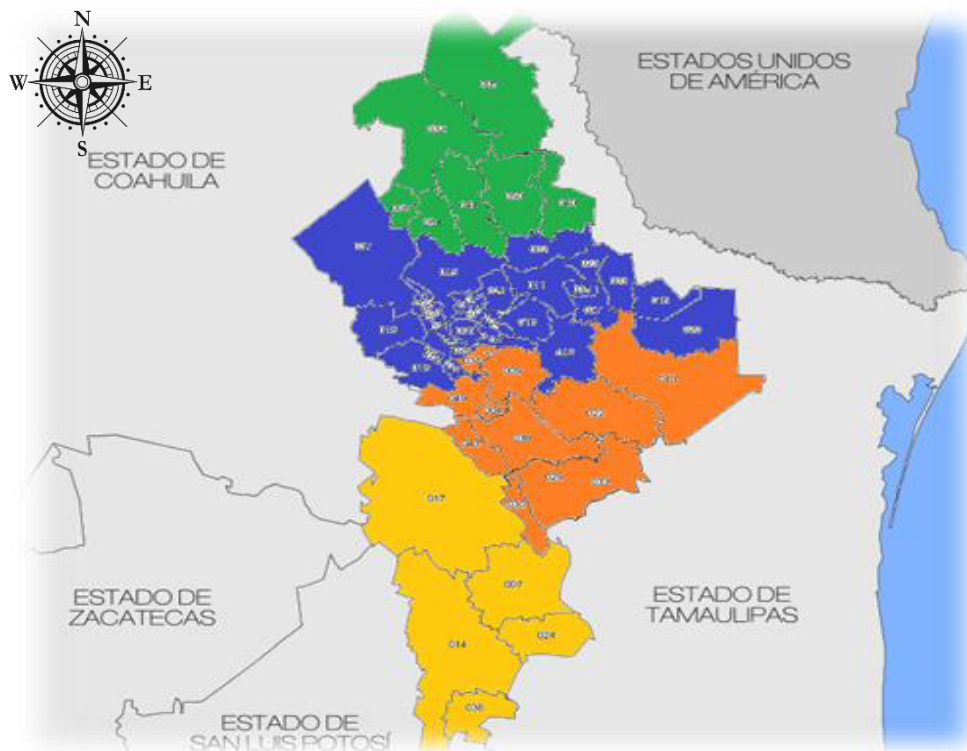
### *5.2.2 Área de Muestreo*

La presente investigación se realizó en el estado de Nuevo León ubicado al Noreste de México, comprendiendo las latitudes (23° 11' Este, 27° 49' Sur) y las longitudes (101° 14' Este y 98° 26' Oeste) (INEGI, 2012). Este colinda al Norte con Texas, al sur con San Luis de Potosí, al este con Tamaulipas y por último en dirección oeste con Coahuila y Zacatecas. El estado de Nuevo León se divide en cuatro Distritos de Desarrollo Rural (DDR) los cuales son Anáhuac, Apodaca, Montemorelos y Galeana (figura 3). Estos DDR hacia su interior comprenden

zonas con características agroecológicas y socio-económicas semejantes para las actividades agropecuarias y agroindustriales Cada DDR está compuesto por varios municipios que se muestran en la figura 3.

### 5.2.3 Especies animales incluidas en el estudio y tamaño de muestra.

Nuevo León es un estado que por sus características geográficas y sus costumbres gastronómicas se consume una cantidad considerable de carne de caprino y ovino, así como los productos derivados de estas especies (leche, piel, etc.). Por lo que la producción de estas dos especies se desarrolla ampliamente en esta zona junto con la producción bovina. La producción de estas especies al igual que todas las especies animales no están exentas de enfermedades por lo que el diagnóstico y control de las mismas es un factor importante en el desarrollo de esta actividad. Investigaciones previas en el estado de Nuevo León han demostrado la presencia y circulación de pestivirus en unidades de producción pecuaria (UPP) de bovinos, así como la presencia de animales persistentemente infectados que se han caracterizado pertenece a la especie BVDV. Para los propósitos del presente estudio resulta de interés el reconocer si en las UPP de caprinos y ovinos del estado ocurre la presencia o evidencia de actividad de pestivirus en estos pequeños rumiantes.



**Figura 3. Distritos de Desarrollo Rural (DDR´s) del estado de Nuevo León; México.**

El área verde representa el DDR de Anáhuac comprendiendo los municipios de Anáhuac, Bustamante, Lampazos de Naranjo, Paras, Sabinas Hidalgo, Vallecillo y Villaldama. El DDR de Apodaca marcado con azul está conformado por Abasolo, Agualeguas, Apodaca, Carmen, Cerralvo, Ciénaga de Flores, Dr. Coss, Dr. González, Escobedo, García, Gral. Bravo, Gral. Treviño, Gral. Zuazua, Guadalupe, Hidalgo, Higuera, Los Aldamas, Los Herreras, Los Ramones, Marín, Melchor Ocampo, Mina, Monterrey, Pesquería, Salinas Victoria, San Nicolás de los Garza, San Pedro Garza García y Santa Catarina. La coloración naranja corresponde al DDR de Montemorelos, donde se encuentran Cadereyta Jiménez, China, Gral. Terán, Hualahuises, Iturbide, Juárez, Linares, Montemorelos, Rayones y Santiago. El área de color amarillo representa al DDR Galeana conformado por los municipios de: Aramberri, Dr. Arroyo, Galena, Gral. Zaragoza y Mier y Noriega.

Para el cálculo de tamaño de muestra de ovinos y caprinos fueron considerados sólo las UPP´s registradas en el padrón de beneficiarios del año 2014 del Programa de Producción Pecuaria Sustentable y Ordenamiento Ganadero y

Apícola Fomento Ganadero (PROGAN) obtenidos de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). En base a las UPP's registradas y el número de animales por UPP se estableció la población participante en este programa de las dos especies (N) y se tomaron éstos datos para determinar el tamaño de muestra (n).

El número de UPP tanto en ovinos como en caprinos, considerados como la unidad de muestreo, se determinó con el programa WinEpi® (de Blas, Ruiz-Zarzuela I, & A., 2006), tomando como base la N de UPP registrados en PROGAN. Es decir, nuestra muestra fueron las unidades de producción.

Debido a que en las UPP de las cuatro DDR no tienen una población homogénea se decidió establecer el número de muestras por UPP con un estudio multietápico, aplicando la fórmula de efecto de diseño que minimiza la desviación estándar entre las poblaciones con un nivel de confianza el 95% y una prevalencia esperada del 50% debido a que no existen datos previos de la presencia de *Pestivirus* en rumiantes pequeños del Noreste de México.

Se aplicó la siguiente formula de efecto de diseño para minimizar la desviación estándar entre las poblaciones (Magaña-Urbina, Solorio Rivera, & Segura-Correa, 2005).

$$D = \left[ \frac{n}{\frac{NZ^2 * pq}{Nd^2 + Z^2 * pq}} \right]$$

Dónde:  $n$  = tamaño de la muestra;  $D$  = efecto de diseño;  $N$  = tamaño de la población (2463 y 787, caprinos y ovinos respectivamente);  $Z$  = valor de la tabla de  $Z$  con un nivel de confianza del 95% (1.96);  $p$  = prevalencia esperada (0.50);  $q=1-p$ ;  $d$  = precisión

Para la determinación de los factores de riesgo se aplicó una encuesta donde se recabaron datos sobre funcionamiento general del hato y enfocado en bioseguridad, problemas reproductivos y de salud individual y grupal (ver anexo 1).

#### 5.2.4 Tipo de muestras

Las muestras seleccionadas para este estudio fue sangre tomada a partir de la vena yugular tanto de ovinos como caprinos con tubos al vacío (con y sin EDTA) y agujas doble filo (Vacutainer®, Becton-Dickinson, USA). Los tubos obtenidos se registraron con los datos del UPP, especie, región del muestreo y registro del animal donde se tomaron las muestras. Las muestras de sangre se transportaron en refrigeración al Departamento de Virología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma de Nuevo León para su procesamiento.

A partir de estas muestras se obtuvo el suero (tubos sin anticoagulante) y el plasma (tubos con EDTA) después de una centrifugación a 2500 rpm / 5 minutos.

El suero y el plasma se almacenaron a -20 °C hasta su uso. En las muestras de sangre con EDTA también se separó el paquete leucocitario y se conservó a -70 °C para su posterior uso en pruebas moleculares.

#### 5.2.5 Metodología para la detección anticuerpos contra Pestivirus

Para establecer la seroprevalencia de Pestivirus en ovinos y caprinos del estado de Nuevo León se utilizó una ELSA comercial de competición (INgezim BVD COMPAC®, INGENASA) que detecta anticuerpos específicos frente al antígeno NS2-3 (p80/p125 antígeno viral inactivado) común en todos los *Pestivirus*. La sensibilidad y especificidad de la prueba son de 95% y 92.0% respectivamente (datos proporcionados por el fabricante).

La detección de anticuerpos anti-pestivirus se realizó siguiendo las instrucciones incluidas por el fabricante en el estuche comercial y se describen a continuación. En primer lugar, se realizó una dilución de la muestra siguiendo las instrucciones de estuche comercial de 1:5 con el diluyente proporcionado en el mismo (20 µl suero problema y 80 µl de diluyente). A una placa de 96 pocillos proporcionada en el estuche comercial cuya pared esta tapizada con la proteína p80/p125 se le agregaron 100 µl de la muestra diluida y se incubó a 37 °C. Los controles positivo y negativo proporcionados en el estuche se procesaron de la misma forma.

Después del periodo de incubación se agregaron a cada pocillo 50 µl de conjugado (dilución de 1:100 del conjugado (monoclonal anticuerpo contra BVDV marcado con peroxidasa) y diluyente proporcionado en el estuche) y se agitaron suavemente para mezclar las soluciones. Después de 1 hora a temperatura ambiente se retiró el sobrenadante de cada pocillo por decantación y se lavó cada pocillo con 300 µl de solución de lavado (1 volumen de solución de lavado por 24 volúmenes de agua destilada), esta etapa se repitió 5 veces.

Posterior al lavado se agregó 100 µl de sustrato (TMB) y se incubó la reacción por 15 minutos a temperatura ambiente y en un ambiente oscuro. Finalmente se agregaron 100 µl de solución de frenado. La lectura se realizó antes de los 5 minutos con un lector de Elisa a una longitud de onda de 450 nm.

Los resultados del test se consideraron válidos cuando la absorbancia del control positivo fue menor a 0.4 y la absorbancia del control negativo mayor a 0.8 según indicaciones del estuche comercial.

Para determinar que una muestra era positiva o negativa se realizó el cálculo del Cut off con las siguientes fórmulas:

Cut off positivo = 0.5 X absorbancia del control negativo

Cut off negativo = 0.55 X absorbancia del control negativo

Las muestras se consideraron positivas cuando su valor de absorbancia fue inferior al cut off positivo y se consideraron negativas cuando su valor de absorbancia era superior al cut off negativo.

### 5.2.6 Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa

### 5.2.7 Extracción de ARN

La extracción de ARN, se realizó de los sobrenadantes de las muestras procesadas, mediante la técnica Trizol-Reagent®. Se colocaron 100 µl de plasma en un microtubo de 2 ml; agregando posteriormente 1 ml de reactivo Trizol-Reagent®. Las muestras se agitaron por 30 seg con un vórtex (Daigger vórtex Genie 2) y después de una incubación por 10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó la muestra a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. En este proceso la muestra se separó en una capa superior clara acuosa (contiene RNA), una interfase (DNA) y una capa roja orgánica al fondo (proteínas). Con cuidado se recolectó con una micropipeta la fase acuosa y se colocó en un nuevo tubo.

A esta fase acuosa se le agregaron 0.5 ml de alcohol isopropílico (cuando se usó 1 ml de TRIZOL- Reagent® para el homogenizado inicial) se incubó por 10 min a TA (en este paso se precipita el ARN). En seguida se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C (formación de pellet de RNA). Una vez identificado este último se elimina el alcohol isopropílico con una micropipeta de 200 µl. El pellet de ARN se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se mezcló por inversión y se centrifugó a 8,000 rpm por 5 min a 4 °C, finalmente se retiró el etanol y se repitió el paso 2 veces, el pellet se dejó secar a TA, y finalmente se resuspendió en 25 µl de agua para PCR. El RNA se conservó a -70 °C hasta su uso (Cedillo Rosales, 2004).

### 5.2.8 Diseño de Primers para la RT-PCR

Los primers usados para esta técnica fueron OL 100 (5' CAT GCC C (AT) (TC) AGT AGG ACT AGC 3') y el OL 380R (5'-AAC TCC ATG TGC CAT GTA GAG-3' (Cedillo Rosales, 2004), así como PV02 (5' GTG GAC GAGGGC ATG CC -3') y PV03R (5'-TCC ATG TGC CAT GTA CAG CAG-3') (Becher, Orlich, & Thiel, 1998) situados dentro de la región 5 UTR' altamente conservadas dentro del género *Pestivirus*.

Además de los primers OL100 y OL 380R, se diseñaron combinaciones de primers "panpestivirus degenerados", mismos que fueron enviados para su síntesis de forma comercial (Industrias BIOSELEC S.A. de C.V. Eurofins/Genomics).

Lo anterior fue realizado con el propósito de ampliar el espectro de detección de *Pestivirus* en las muestras de plasma. Las secuencias que se usaron para la creación de estos primers, fueron obtenidas a partir del GenBank mediante el código de acceso para las secuencias completas de *Pestivirus* reportado hasta la fecha (Tabla 1).

El alineamiento de todas las secuencias se realizó por medio del programa MEGA 7<sup>®</sup> el cual incluye el programa Clustal W. Posterior a este lineamiento se determinaron las zonas del genoma más conservadas dentro de este género y se utilizaron para el diseño de los primers. Como estas regiones son variables se

diseñaron primers degenerados que potencialmente pueden amplificar un número mayor de cepas dentro de las distintas especies del género *Pestivirus* (Tabla 2).

Para la realización de la RT-PCR y PCR anidado se utilizaron los primers reportados por (Cedillo Rosales, 2004) (Tabla 2).

#### 5.2.9 RT-PCR de la región 5' UTR'

La amplificación de la región 5'UTR mediante RT-PCR en las muestras clínicas fue realizadas con el estuche comercial "Access RT-PCR System" (PROMEGA®), siguiendo las instrucciones del fabricante, que se describen a continuación.

**Tabla 1. Secuencias genómicas completas de cepas de *Pestivirus* usadas para el diseño de los primers.**

<b>Número</b>	<b>Código de acceso</b>	<b>Especie / cepa</b>	<b>Pares de Bases</b>
1	M96751	BVDV – 1 SD1	12,308
2	M31182	BVDV-1 NADL	12,573
3	NC_001461	BVDV-1	12,573
4	M96687	BVDV-1 Osloss	12,480
5	AF526381	BVDV-1 ZM-95	12,220
6	KF896608	BVDV 1 BEGA	12,193
7	U18059	BVDV-2 890	12,513
8	NC_002032	BVDV-2	12,255
9	AF002227	BVDV-2 C413	12,255
10	AB871953	BVDV-3 D32/00_ 'HoBi' Atípica	12,265
11	KJ627180	BVDV-3 Italy-68/13cp	12,549
12	NC_012812	BVDV-3 Th/04_KhonKaen	12,337
13	AF037405	BDV X818	12,333
14	U70263	BDV BD31	12,268
15	AF144618	BDV 2 Reindeer -1 V-60 Krefeld	12,318
16	GQ902940	BDV-3 Gifhorn	12,326
17	KF925348	BDV-3 Gifhorn	12,325
18	GU270877	BDV 4 Chamois-1, H2121	12,305
19	KJ463423	BDV Coos Bay 5c	12,588
20	JX428945	Pestivirus Aydin/04-TR	12,292
21	KF918753	BDV Aveyron	12,284
22	KM408491	Tunisian Sheep, Burdur/05-R	12,281
23	U90951	CSFV Alfort A19	12,298
24	J04358	CSFV Alfort/Tuebingen	12,297
25	AF091661	CSFV Brescia	12,297
26	AY578687	CSFV BRESCIAX	12,285
27	AY382481	CSFV	12,310
28	NC_002657	CSFV	12,301
29	AY259122	CSFV Riems	12,289
30	AF326963	CSFV Eystруп	12,301
31	EF100713	Bungowannah	12,656
32	AF144617	Giraffe-1 H138	12,602
33	KJ660072	Giraffe PG-2	12,264
34	AY781152	Proghorne Antelope	12,273

**Tabla 2. Primers degenerados diseñados para amplificar diversos segmentos hacia la región 5' del genoma de *Pestivirus*.**

Nombre	Secuencia	Localización (*)	Polaridad
<b>OL 380-Rm</b>	5'- AMYTCCATRTBYCATGTACAG-3'	369-397	-
<b>OL 380-Fm</b>	5'-CTGTACATGRVAYATGGARKT-3'	369-397	+
<b>OL 1000-Rm</b>	5'-ASNACDATNGTNGCRTG-3'	1006-1030	-
<b>OL 1000-Fm</b>	5'-GAYGCNACNATHGTNST-3'	1006-1030	+
<b>OL 1400-Rm</b>	5'-RCCARTTRCACCANCCRTR-3'	1426-1452	-

(\*) localización con respecto a la cepa NADL-1 (BVDV-1, GenBank: M31182)

Se preparó un master mix agregando el agua libre de nucleasas, el buffer de reacción 5x AMV/ *Tfl*, los dNTPs, los primers reversa y codificante y el MgSO<sub>4</sub> (25 mM) la mezcla se agitó por 10 segundos en un vórtex, posteriormente se agregó la transcriptasa reversa AMV y la DNA polimerasa *Tfl* y se mezcló nuevamente por 10 segundos. En un tubo de 200 µl se agregaron 48 µl de este master mix y además de 2 µl del RNA de la muestra. Los componentes, molaridades y volúmenes de trabajo por muestra individual se describen en la Tabla 3.

Las muestras se colocan en un termociclador con el siguiente programa: 1 ciclo de 45 °C por 45 min. Para la transcripción reversa; 1 ciclo de 94 grados por 2 min. Para la inactivación de la enzima AMV/RT y la desnaturalización inicial del cDNA; y 40 ciclos de desnaturalización a 94 grados por 30 sec; alineamiento de primers de 55 °C por 1 min; extensión de 68 °C por 2 min. Además de un ciclo de extensión final de 68 por 7 min. y un ciclo de 4 °C para condensación de la muestra de por lo menos 1 minuto. Cada ensayo incluyó como control positivo a la cepa NADL de BVDV-1, el control interno de la reacción del estuche comercial y como control negativo de contaminación, agua tratada con DEPC.

**Tabla 3. Componentes del estuche comercial “Access RT-PCR System” (PROMEGA®) para la reacción de RT-PCR**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración Final</b>
Agua libre de nucleasas	26.4 µl	
Buffer de Reacción AMV/ <i>Tfl</i>	10 µl	1X
Mix de dNTPs	1 µl	0.2 mM
Primer Reverse (50 pmol)	3.3 µl	1 µM
Primer Codificante (50 pmol)	3.3 µl	1 µM
MgSO <sub>4</sub> 25 mM	2 µl	1 mM
Transcriptasa Reversa AMV	1 µl	0.1 u/ µl
DNA Polimerasa <i>Tfl</i>	1 µl	0.1 u/ µl
RNA de muestra o control	2 µl	
<b>Volumen Final</b>	<b>50 µl</b>	

Los productos amplificadores se separaron en geles de agarosa al 1.5% esperando un producto de amplificación de 323 pb para las muestras positivas al control interno del gen de Kanamicina del estuche comercial de PROMEGA®. Donde se determinó la presencia de RNA en las muestras, a estos amplicones se les realizó un PCR Anidado posterior.

#### 5.2.10 PCR Anidado de la región 5' UTR

Los amplicones resultantes del RT-PCR fueron sujetos a un PCR anidado para amplificar una parte de la región 5' UTR de *Pestivirus*. La amplificación se realizó con la ayuda del estuche comercial "Taq- & GO™ Ready-to-use PCR Mix" ([www.mpbio.com](http://www.mpbio.com)) siguiendo las instrucciones del fabricante, que se describen a continuación.

Se preparó un master mix agregando el agua miliQ, el primer codificante PV 02 (50nM), Primer Reverse PV 03R (50nM), Taq-&Go™ (5XC), la mezcla se agitó por 10 segundos en un vórtex. En un tubo para PCR de 200 µl se depositan 45 µl de esta mezcla a la cual se agregan 5 µl del amplicon de la muestra de RT-PCR. Las concentraciones y las molaridades de los reactivos se especifican la tabla 4.

Las muestras se colocan en un termociclador con el siguiente programa: para la amplificación 1 ciclo de 94°C por 30 seg. para la desnaturalización inicial del cDNA. Seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C-30 seg.; alineamiento de primers de 57°C por 30 seg; extensión de 72 °C por 30 seg. Además de un ciclo de extensión final de 72 °C-5 min. y 4°C por al menos 1min. para condensación de la muestra. Cada ensayo incluyó como control positivo cDNA de la cepa NADL de BVDV-1 y como control negativo de contaminación, agua tratada con DEPC.

**Tabla 4. Componentes del estuche comercial “Taq- & GO™ Ready-to-use PCR Mix” de MP Biomedicals, volumen y concentración final para reacción.**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración Final</b>
Agua miliQ	31 µl	
Primer Codificante PV 02	2 µl	50 nM
Primer Reverse PV 03R	2 µl	50 nM
Taq- & GO™ (5XC) (*)	10 µl	1.5 U Polimerasa DNA <i>Taq</i>
		10 nm dNTP´s c/u: 200µM final
		Buffer reacción 1XC
		1.5mM MgCl <sub>2</sub>
cDNA o control	5 µl	>100pg – <100ng (*)
<b>Volumen final</b>	<b>50 µl</b>	

(\*) La concentración final es según lo señalado por el fabricante del estuche comercial.

Los productos amplificadores se separaron en geles de agarosa al 2% con el Buffer SB1X (50 ml. Buffer 20X, 35 gr. Ácido bórico (F.W. 61.83) y 6 gr. De NaOH (F.W. 61.83), 1 litro de agua destilada, pH 8, estéril) y 950 ml. Agua destilada y esterilizada), en una electroforesis de 90 min. con 100 mV, esperando un producto de amplificación de 167 pb para las muestras positivas a *Pestivirus*.

### **5.3 Secuenciación y análisis de las secuencias.**

Los segmentos amplificados / productos de PCR fueron enviados para su purificación y secuenciación a la empresa MacroGen® (MacroGen Corp., <https://www.macrogenusa.com>), de los Estados Unidos de América. Los primers

que se utilizaron para la secuenciación fueron el PV02 (5'-GTGGACGAGGGGCATGCC-3') y PV03R (5'-TCCATGTGCCATGTACAGCAG-3') a una concentración de (2-5 pmol/μl, 10 μl para reacción inicial y 2 μl por reacción adicional), para obtener la secuencia en ambos sentidos.

Las secuencias obtenidas fueron editadas y manipuladas con el programa EditSeq del Software DNASTAR versión 13. Las secuencias fueron comparadas entre ellas y contra la región correspondiente de las distintas cepas de especies de *Pestivirus* (tabla 1). Se ubicaron las regiones que correspondían a los primers codificante y reversa. Estas regiones fueron eliminadas para los análisis subsecuentes y a fin de obtener la secuencia consenso de cada producto/cepa secuenciada.

La secuencia consenso fue comparada por homología en la base de datos del GenBank® mediante el programa BLAST versión 2.6.0 (blastn) (Camacho et al., 2009).

La realización de los alineamientos múltiples, para así obtener las diferencias en nucleótidos de las secuencias obtenidas y las de referencia (M31182, BVDV-1 NADL, M96687; BVDV-1 Osloss; U18059, BVDV-2 890; AF037405, BDV X818; J04358, CSFV Alfort/Tuebingen; AF144617, Giraffe-1 H138), fue llevada a cabo con el programa MegAlign integrado en el Software DNASTAR versión 13. Adicionalmente se utilizó el programa CLUSTALW para realizar el alineamiento múltiple de las secuencias y en base a estos resultados se obtuvo la divergencia

y homología entre las secuencias; así como con las reportadas en el GenBank®. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

#### **5.4 Análisis estadístico de resultados**

La variable del estudio fue la presencia o ausencia de *Pestivirus* en caprinos y ovinos. Al no existir información previa acerca de la presencia o seroprevalencia contra *Pestivirus* en pequeños rumiantes de México, la prevalencia serológica y molecular se estableció mediante la fórmula:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Animales Positivos}}{\text{Total de analizados}} \times 100$$

Se determinó el grado de asociación entre la seroprevalencia con la especie (caprina, ovina), hato y su procedencia o ubicación (DDR), que se analizaron mediante el estadístico de Chi – cuadrada, la cual nos indica que si el valor calculado es mayor a 0.05 ( $P > 0.05$ ), se considera a que no existe asociación entre las variables estudiadas, pero si el valor es menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ) nos indica que si existe una asociación entre las variables que estamos evaluando.

Además, se calcularon los respectivos odds ratios, estimando la relación entre el factor de riesgo y la variable del estudio en este caso la presencia o no de los *Pestivirus*. La interpretación de odds ratio se toman en base a 1; estos significando a que, si un dato es menor de 1, el factor al que el individuo está expuesto se considera como un factor protector; si el estimador es igual a 1, no existe una asociación entre la enfermedad y la exposición al factor; y si un estimador es mayor de 1; corresponde a que el factor al que el individuo está

expuesto es un factor de riesgo. Los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda del paquete computacional WinEpi® (de Blas et al., 2006).

Posteriormente se realizó un análisis multivariado, que incluyó simultáneamente los factores de riesgo significativos según el análisis de chi – cuadrada entre ellos la presencia de *pestivirus* tanto en ovinos como caprinos así como en la región, tamaño del hato, el tipo de explotación, además del tipo de animal silvestres presente en el área, animales de bajo peso al nacimiento y su retraso de crecimiento, también se incluyó si existió la introducción de nuevos animales a la UPP, y si existían medidas de bioseguridad como cuarentena y la presencia de veterinarios esos factores fueron evaluados en base a la encuesta, para luego calcular los “odds ratios” ajustados mediante un análisis de regresión logística, este se encargó de que todos los factores de riesgo fueran evaluados contra todos los elementos, esto permitió que ningún componente significativo fuera descartado aún su nivel de significancia fuera de  $P > 0.05$  utilizando el programa computacional SAS.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Tamaño de Muestra**

La toma de muestra se empezó a partir de los cuatro DDR, debido a que no es homogénea la distribución de UPP's ovinas y caprinas en el estado de nuevo León se tomaron 15 UPP's caprinos y 7 ovinos del DDR de Anáhuac; en el caso de Apodaca se muestrearon 24 UPP's caprinos y 21 ovinos, Para Montemorelos fueron tan solo 8 UPP's ovinas, en este caso se dio este bajo número; porque esta área está ocurren más UPP's de ovinos con respecto a los caprinos; además que las UPP's son menores en extensión que el resto de DDR's. Para la región de Galeana se tomaron muestras de 28 producciones caprinas y 16 ovinas. En total se obtuvieron muestras de 119 UPP's, lo cual resultó de la aplicación del efecto de diseño y dado que la distribución de las especies animales sujetas de estudio, como se mencionó anteriormente, es muy heterogénea.

Se muestrearon 5 o 10 animales hatos que sean menores o mayores de 100 animales respectivamente mediante el efecto de diseño. Dando como resultado un total 67 hatos caprinos (15 hatos de Anáhuac; 24 hatos de Apodaca; 28 hatos de Galeana y ningún hato caprino de Montemorelos) y 52 hatos ovinos (7 de Anáhuac; 21 hatos de Apodaca; 16 hatos de Galeana y 8 hatos de Montemorelos), que se muestrearon en Nuevo León y los recursos disponibles. Esto proporcionó una muestra más real de los animales que se deben tomar de

los 335 UPP caprinos y 260 UPP ovinos, que se calcularon mediante el programa estadístico WinEpi® (de Blas et al., 2006).

Estas 840 muestras de suero de 119 hatos ovinos o caprino fueron obtenidas de los 4 Distritos de Desarrollo Rural de Nuevo León y analizados para determinar la presencia de anticuerpos contra pestivirus con un estuche comercial de ELISA de competencia (ELISA INgezim BVD COMPAC®), dando así una inferencia entre las muestras de caprinos y de ovinos sobre la población que hay en Nuevo León.

## 6.2 Serología

La seroprevalencia aparente del total de las muestras independientes de la especie, procedencia o tipo hato fue 36.67% (308/840) (CI<sub>95%</sub> 31.41-39.93%) mientras que la prevalencia real calculada fue 32.95% (CI<sub>95%</sub> 29.77-36.13%). Por especie (Tabla 5) la seroprevalencia aparente y real en ovinos fue 44.36% (CI<sub>95%</sub> 39.49-49.24%) y 41.79% (CI<sub>95%</sub> 36.95-46.63%) y para caprinos 29.71% (CI<sub>95%</sub> 25.44-33.97%) y 24.95% (CI<sub>95%</sub> 20.91-28.99%), respectivamente. Se encontró asociación ( $P < 0.05$ ) entre la prevalencia y especie animal.

**Tabla 5. Proporción de seropositividad contra *Pestivirus* acorde a la especie.**

<b>Especie</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Negativos (%)</b>	<b>Total</b>
<b>Ovinos</b>	177 (44.4)	222 (55.6)	399
<b>Caprinos</b>	131 (29.7)	310 (70.3)	441
<b>Total</b>	308 (36.7)	532 (63.3)	840

La seroprevalencia por hato en ambas especies mostró índices muy elevados con una prevalencia aparente de 90.38 (CI<sub>95%</sub> 82.37-98.40%) y prevalencia real

de 94.69% (CI<sub>95%</sub> 88.6-100%) para los hatos ovinos, mientras que para los hatos caprinos fue 61.19% (CI<sub>95%</sub> 49.53-72.86%) y 61.14% (CI<sub>95%</sub> 49.47-72.81%) respectivamente, el total de hatos seropositivos a *Pestivirus* fue 73.95% (Tabla 6; P < 0.05). Esto presentó también un 5.96 (CI<sub>95%</sub> 2.24 – 15.83), más probabilidades de infecciones en hatos ovinos.

**Tabla 6. Proporción de seropositividad contra *Pestivirus* en hatos ovinos o caprinos el estado de Nuevo León; México.**

<b>Tipo de Hato</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Negativos (%)</b>	<b>UPP's</b>
<b>Ovino</b>	47 (90.4)	5 (9.6)	52
<b>Caprino</b>	41 (61.2)	26 (38.8)	67
<b>Total</b>	88 (73.9)	31 (26.1)	119

En la tabla 7 se muestra la distribución de la seropositividad de acuerdo a los 4 DDR comparados. Los DDR comprendieron los siguientes municipios: DDR Anáhuac (Anáhuac, Bustamante, Lampazos de Naranjo, Parás, Sabinas Hidalgo, Villaldama; zona norte), DDR Apodaca (Agualeguas, Ciénaga de Flores, Dr. González, Escobedo, García, General Bravo, General Zuazua, Higuera, Los Ramones, Marín, Mina y Salinas Victoria; zona centro), DDR Galeana (Aramberri, Dr. Arroyo y Galeana, zona sur) y DDR Montemorelos (China, General Terán, Juárez y Linares zona oriente). Acorde a los resultados serológicos del DDR, se obtuvo una seroprevalencia general (independientemente del tipo de hato) de 69.5% (Tabla 7), resultando el distrito de Apodaca el de menor seroprevalencia

con 55.56% y Montemorelos el de mayor seroprevalencia con 100%, seguido de Galeana y Anáhuac con 84.09% y 81.8%, respectivamente.

De estos hatos el distrito rural con más hatos ovinos seropositivos (100%) fue Montemorelos y la con mayor cantidad de hatos caprinos seropositivos (56.76%) se encontró en Galeana (Tabla 7). Por otro lado, la menor cantidad de hatos seropositivos se observó en: Anáhuac para el ganado ovino y para el ganado caprino se localizó en Montemorelos. Al comparar las cuatro regiones entre sí, la serología de la región de Anáhuac y Apodaca fue diferente, en comparación con Anáhuac y Montemorelos que fue similar; además de Anáhuac y Galeana debido a que en estas dos últimas comparaciones existe igualdad entre los distritos diciendo que no hay una diferencia significativa  $P > 0.05$ . Entre Apodaca y Montemorelos la diferencia es no significativa, debido a la variabilidad entre su seropositividad y negatividad;  $P > 0.05$ . Por último, no existe una relación significativa entre las comparaciones de los distintos distritos de desarrollo rural,  $P > 0.05$ .

Entre estos factores de riesgo analizados (Tabla 8), se encontraron 7 elementos los cuales tuvieron el mayor impacto en la circulación de *Pestivirus* en pequeños rumiantes (Tabla 8), entre estos factores significativos se encuentran las regiones más susceptibles a *pestivirus*, la especie animal más susceptible al virus, si la presencia o no del veterinario tiene repercusión en la diseminación de los *pestivirus*, además si el sistema de producción y la presencia de otros animales en el área infunden en la persistencia del virus. También se observa que

introducción de nuevos animales y la medida de bioseguridad como la cuarentena son elementos en la persistencia del patógeno.

### **6.3 RT-PCR y PCR – Anidado**

A partir de 21 pools de plasma de 105 muestras, de UPP's con una seropositividad superior al 90% se realizó un RT-PCR con los primers diseñados, no se obtuvo una banda de 280 pb, dando resultados negativos, se realizó por consiguiente un PCR anidado utilizando los primers descritos por (Cedillo Rosales, 2004) en los cuales se observó la amplificación de 5 fragmentos positivos en la región 5' UTR a *pestivirus* de 167 pb. Estas muestras provinieron de UPP's de Linares, Galeana, Bustamante (Figura 4), Anáhuac y Dr. Arroyo, siendo las primeras tres muestras pertenecientes a UPP's de la especie ovina y los últimos dos a la especie caprina.

**Tabla 7.- Seropositividad contra Pestivirus y distribución por hato de especie acorde al Distrito de Desarrollo Rural (DDR).**

<b>DDR</b>	<b>Tipo hato</b>	<b>Seropositivos</b>		<b>Seronegativos</b>		<b>Total de hatos</b>
<b>Anáhuac**</b>	Ovino	38.9 % (7)	81.8 % (18)	0.00 %	18.2 % (4)	22
	Caprino	61.1 % (11)		100.0 % (4)		
<b>Apodaca**</b>	Ovino	64.0 (16)	55.6 (25)	25.0 (5)	44.4 (20)	45
	Caprino	36.0 (9)		75.0 (15)		
<b>Galeana</b>	Ovino	43.2 (16)	84.1 (37)	0.0	15.9 (7)	44
	Caprino	56.8 (21)		100.0 (7)		
<b>Montemorelos</b>	Ovino	100.0 (8)	100.0 (8)	0.0	0.0 (0)	8
	Caprino	0.0		0.0		
<b>Total</b>	Ovino	53.4 (47)	69.5 (88)	16.1 (5)	30.5 (31)	119
	Caprino	46.6 (41)		83.9 (26)		

\*\* P<0.05

Los factores de riesgo medidos como significativos por medio del análisis de Chi – cuadrada a la encuesta respondida por los productores de los hatos muestreados, se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8. Factores de Riesgo Asociados a la Presencia de Pestivirus en Rumiantes Pequeños.**

Variable/ Categoría	Frecuencia	Porcentaje	Valor X <sup>2</sup>	P	Odds Ratio (IC 95 %)
<b>Región</b>					2.04 (1.16-3.57)
Anáhuac					
Pres. Pestivirus.	56	6.67			
1	56	6.67			
0					
Galeana					2.27 (1.32-3.93)
Pres. Pestivirus.					
1	129	15.36			
0	187	22.26	32.98	<0.0001	
Apodaca					*
Pres. Pestivirus.					
1	84	10.00			
0	426	29.29			
Montemorelos					3 (1.74-5.17)
Pres. Pestivirus.					
1	39	4.64			
0	43	5.12			
<b>Especie</b>					
Ovina					2.36 (1.28- 4.35)
Pestivirus presente	155	18.45			
1	204	24.29			
0			11.44	0.0007	
Caprina					*
Pestivirus presente	153	18.21			
1	328	39.04			
0					
<b>Sistema de Producción</b>					
Leche					1.5 (0.83-2.72)
1	136	16.19			
0	228	27.14	0.13	0.7143	
Carne					
1	172	20.48			
0	304	36.19			
<b>Tamaño de Hato</b>					
1-60					*
1	115	13.69			
0	152	18.10			
61-100					
1	80	9.52			
0	138	16.43	8.29	0.0158	
111-2000					
1	113	13.45			
0	242	28.81			
<b>Tipo de Explotación</b>					
Intensivo					*
1	90	10.71			
0	189	22.50			
Semi-Intensivo					
1	26	3.10			
0	65	7.74	8.45	0.0146	
Extensivo					
1	192	22.86			
0	278	33.10			

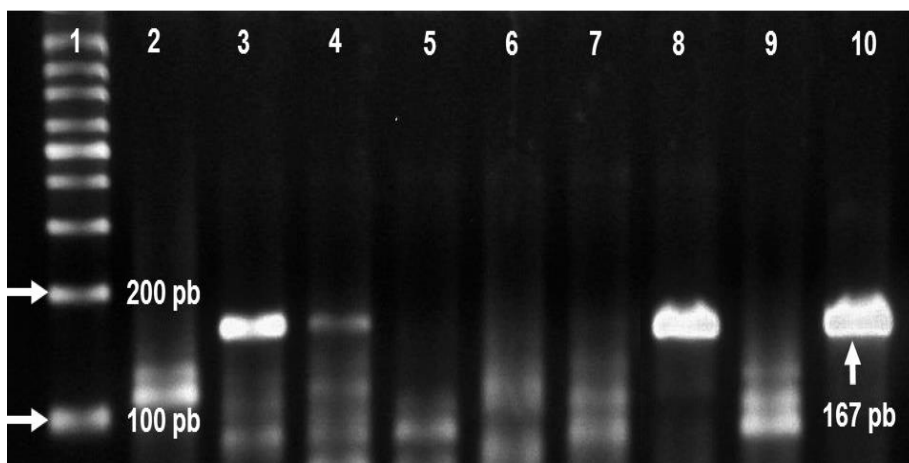
1: Denota una respuesta a sí está presente o positiva. 2: Expresa una negación o ausencia. \* No se determinó el odds ratio.

Variable/ Categoría	Frecuencia	Porcentaje	Valor X <sup>2</sup>	P	Odds Ratio (IC 95 %)
<b>Presencia de otros animales Domésticos</b>					
Si					
1	188	22.38			
0	308	36.67	0.7975	0.3718	1.46 (0.93-2.3)
No					
1	120	14.29			
0	224	26.67			
<b>Animales Domésticos</b>					
No se sabe					
1	90	10.71			*
0	133	15.83			
Bovino					
1	109	12.98			
0	191	22.74	2.36	0.5004	
Cerdo					
1	44	5.24			
0	77	9.17			
Otros animales					
1	65	7.74			
0	131	15.60			
<b>Animales Silvestres</b>					
Sí					
1	187	22.26			*
0	323	38.45	0.00	1.00	
No					
1	121	14.40			
0	209	24.88			
<b>Tipo de Animal Silvestre</b>					
No sabe					
1	74	8.81			*
0	111	13.21			
Venado					
1	105	12.50			
0	140	16.67			
Jabalí					
1	47	5.60			
0	102	12.14	9.71	0.0212	
Otro					
1	82	9.76			
0	179	21.31			
<b>Vacunación</b>					
Sí					
1	281	33.45			*
0	482	57.38	0.09	0.7596	
No					
1	27	3.21			
0	50	5.95			
<b>Abortos</b>					
Sí					
1	117	13.93			
0	204	24.29	0.01	0.9178	*
No					
1	191	22.74			
0	328	39.05			

1: Denota una respuesta a sí está presente o positiva. 2: Expresa una negación o ausencia. \* No se determinó el odds ratio.

Variable/ Categoría	Frecuencia	Porcentaje	Valor $\chi^2$	P	Odds Ratio (IC 95 %)
Preñez					*
<50%					
1	31	3.69			
0	64	7.62	0.75	0.3862	
> 50%					
1	277	32.98			
0	468	55.71			
Bajo Peso al Nacer					
Sí					
1	195	23.21			
0	377	44.88	5.12	0.0236	*
No					
1	113	13.45			
0	155	18.45			
Retraso en el Crecimiento					
Sí					*
1	195	23.21			
0	388	46.19	8.50	0.0035	
No					
1	113	13.45			
0	144	17.1			
Malformaciones al Nacer					
Sí					*
1	92	10.95			
0	172	20.48	0.55	0.4591	
No					
1	216	25.71			
0	360	42.86			
Introducción de Animales Nuevos					0.6 (0.39-0.94)
Sí					
1	111	13.21			
0	269	32.02	16.61	<0.0001	
No					
1	197	23.45			
0	263	31.31			
Presencia de Cuarentena					0.58 (0.32-1.06)
Sí					
1	50	5.95			
0	139	16.55	10.95	0.0009	
No					
1	258	30.71			
0	393	46.79			
Asistencia de MVZ					1.89 (1.24-2.87)
Sí					
1	210	25.00			
0	320	28.10	5.40	0.0201	
No					
1	98	11.67			
0	212	25.24			

1: Denota una respuesta a sí está presente o positiva. 2: Expresa una negación o ausencia. \* No se determinó el odds ratio.



**Figura 4. PCR anidado para la amplificación de un segmento de la región 5' UTR de *Pestivirus* en muestras de plasma de ovinos y caprinos procedentes de hatos con elevada seropositividad.**

Se amplificó un segmento de 167 pares de base con los primers PV02, PV03R. **Carril 1:** escalera molecular, **carril 2:** control de contaminación (Agua bidestilada), **carril 3:** Pool de plasma ovino (Linares); **carril 4:** Pool de plasma caprino 2 (Anáhuac), **carril 5:** Pool de plasma caprino 1 (Lampazos), **carril 6:** Pool de plasma caprino 3 (Anáhuac), **carril 7:** Pool de plasma ovino 1 (Galeana), **carril 8:** Pool de plasma ovino 3 (Galeana), **carril 9:** control negativo interno, **carril 10:** RNA de control positivo cepa BVDV-1/NADL. La flecha indica el tamaño de la banda amplificada para pestivirus.

#### 6.4 Secuenciación

Los resultados proporcionados por MacroGen® de las 3 secuencias enviadas a purificación y secuenciación, se editaron por el programa EditSeq obteniendo las secuencias consenso. Estas secuencias fueron manejadas para alinearse junto con múltiples secuencias de Pestivirus con la ayuda del programa MegAlign disponible en el paquete computacional DNASTar Lasergene® y tomando como referencia la secuencia reportada para la cepa NADL (BVDV-1, GenBank: M31182). Dos de las tres secuencias de 147 pb obtenidas de ovinos, resultaron con una homología > 98% a Diarrea Viral Bovina Tipo 1. Estas dos secuencias mostraron su mayor homología con tres aislados de BDV-1 reportadas en Irán en

el año de 7 de Enero de 2007 en el GenBank (código de acceso: EF210355.1; Aislado 9, EF210349.1; Aislado 3 y EF210347.1; Aislado 1) (Esmaelizad & Kargar-Moakhar, 2014). Por otra parte, de la tercera secuencia obtenida de caprinos solo fue posible alinear alrededor de 110 pb con la región 5´UTR de *Pestivirus*. Lo cual fue debido a múltiples inconsistencias en cerca de 30 pb dentro de esta secuencia. Esta secuencia de 110 pb mostró una homología de 98% con un aislado obtenido en el sur de Italia ubicado como BVDV-1 (Decaro et al., 2016).

## 7 DISCUSIÓN

Los *Pestivirus* están considerados como patógenos cosmopolita asociados a infecciones sistémicas, respiratoria, digestivas y reproductivas en diversas especies animales del orden *Artiodactyla* (Tuncer-Goktuna, Alpay, Oner, & Yesilbag, 2016). Las pérdidas económicas a nivel mundial son difíciles de estimar, no obstante, los efectos sobre el aparato reproductor aparentemente contribuyen en gran medida dado sus efectos globales en la rentabilidad. Por otro lado, es de resaltar la habilidad de los *Pestivirus* de perpetuarse en la naturaleza mediante el mecanismo de persistencia en sus hospedadores, además de su capacidad de inmunosuprimir a su hospedador (Giammarioli et al., 2015) dando lugar a infecciones secundarias oportunistas que pueden llevar a los abortos entre otras alteraciones (Tuncer-Goktuna et al., 2016). La importancia económica es marcada generalmente debido a que pueden causar otro tipo de signología tanto problemas respiratorios, gastrointestinales, nerviosos o inclusive repeticiones de estro, reabsorciones fetales o hasta partos normales. No obstante, la característica biológica fundamental propia de los *Pestivirus*, con fuerte impacto en su epidemiología y distribución, es la generación de animales persistentemente infectados (Lindberg & S. Alenius, 1999; Martin et al., 2011).

La disertación fue dirigida a analizar ovinos y caprinos como objetos de estudio, haciendo énfasis en evidenciar la circulación de *Pestivirus* en hatos de estas especies domésticas. Por un lado, dado que no existen antecedentes de la presencia de estos virus en ovinos y caprinos de Nuevo León y de México y por

el otro lado, por la habilidad que muestran los *Pestivirus* para infectar diferentes especies dentro de *Artiodactyla* posibilitando en salto interespecie que conlleva a dificultades en su control o análisis epidemiológico.

Nuevo León se caracteriza por el consumo de carne caprina, principalmente cabrito, u ovina lo cual impulsa la economía del estado, además de la producción de leche o de carne para núcleos familiares para autoconsumo. No obstante, la producción cárnica en toneladas de 2,975 y 1,268 respectivamente (SAGARPA, 2014) no suplen en su totalidad la demanda del estado así como tampoco contribuye significativamente a la producción pecuaria de México. A pesar de las pérdidas económicas asociadas a la presencia de *Pestivirus* en ovinos y caprinos, su presencia o actividad en Nuevo León y México no ha sido abordada. En Nuevo León es muy probable que los signos clínicos inducidos por *Pestivirus* pasen desapercibidos o sean confundidos por otras patología o enfermedades consideradas como endémicas (Mishra et al., 2016b; Ávalos Ramírez et al., 2010), entre las que destacan: Brucelosis, Ectima Contagioso, endoparasitosis, deficiencias de Cobre, Selenio y vitamina E, así como diarreas bacterianas y clostridiosis; entre otros (Ávalos Ramírez et al., 2010).

Se analizaron 4 diferentes áreas de Nuevo León, las cuales han sido divididas en base a una separación estratégica en distritos de desarrollo rural, con condiciones agroecológicas, climatológicas y económicas propias e individuales que se entrelazan entre sí. Las condiciones de los hatos se basaron en lugares de producción extensivos, semi-intensivos o intensivos esto siendo completamente al azar. En términos de bioseguridad de las explotaciones

pecuarias analizadas, se observaron que las medidas o no existen o son muy bajas, esto tal vez, no es debido a que no se quisieran implementar por parte del productor sino por la falta de capital para infraestructura y conocimiento hacia estas medidas o normas. En este trabajo se determinó la presencia de Pestivirus en pequeños rumiantes por medio de serología; y biología molecular y los resultados nos sugieren fuertemente una alta frecuencia de circulación de estos virus en estas especies de rumiantes. Anteriormente en el año 2009 en esta zona del país se reportó la seroprevalencia y presencia molecular del VDVB tipos 1 y 2 en hatos de bovinos del sistema vaca-becerro (Domínguez Díaz & Díaz, 2009). Similarmente, en esta región el BVDV fue diagnosticado en becerros de corral de engorda y asociado a múltiples patologías (Ramírez Romero, Chavarría Martínez, López Mayagoitia, Rodríguez Tovar, & Nevárez Garza, 2012). No obstante, hasta lo que se sabe, no existen reportes previos de la presencia y circulación de Pestivirus en ovinos y caprinos de Nuevo León, del Noreste de México o incluso en el país; por lo que este trabajo representa el primer reporte de la actividad serológica, circulación y presencia de Pestivirus en rumiantes pequeños de México. A pesar del amplio reconocimiento de la amplia dispersión de los Pestivirus a nivel mundial (Celedón et al., 2001; Colom-Cadena et al., 2016; Kaiser, Nebel, Schupbach-Regula, Zanoni, & Schweizer, 2017; Mao et al., 2016; Martin et al., 2015; Maya et al., 2016; Shi et al., 2016; Tuncer-Goktuna et al., 2016), los estudios de la frecuencia serológica en rumiantes pequeños domésticos son muy limitados y escasos. En el presente estudio, los rangos de seropositividad entre hatos y regiones fueron muy amplios. Lo cual concuerda

con estudios similares realizados en otras partes del mundo (Ali et al., 2013; Fernandez-Aguilar et al., 2016; Passler & Walz, 2010; Yazici, Serdar, Gumusova, & Albayrak, 2012). No obstante, se determinó que una relativa alta proporción de hatos ovinos y caprinos resultaron con altos índices de seropositividad, lo cual aunado a la nula aplicación de vacunas anti-*Pestivirus* en estas especies nos indican que en todos los hatos seropositivos analizados los animales se han puesto en contacto con estos virus y que de forma natural han respondido serológicamente contra la infección. Esta observación es de importancia dado que, existe la probabilidad de que infecciones causadas por *Pestivirus* pasen clínicamente desapercibidas y que una buena proporción de las patologías asociadas o no con estos virus sean confundidos con otros factores; limitando la posibilidad de éxito en su diagnóstico y control (Dubovi, 2013; Lindberg & Alenius, 1999). Los parámetros de serofrecuencia observados concuerdan parcialmente a lo obtenidos por otros investigadores en diversas partes del mundo (Ali et al., 2013; Berriatua et al., 2006; Depner, Hubschle, & Liess, 1991; Fernandez-Aguilar et al., 2016; Graham, Calvert, German, & McCullough, 2001; Hyera, Liess, & Frey, 1991; Krametter-Frotscher et al., 2007; Krametter-Froetscher et al., 2006; Loken, 1992; Oguzoglu et al., 2009; Schleiner et al., 2005; Yazici et al., 2012). No obstante, variaciones en el tipo de prueba serológica empleada, factores agroecologicos y de manejo locales, tipo de cepa de *Pestivirus* involucrada y Bioseguridad, entre otros; pueden contribuir a las variaciones en los parámetros serológicos observados. Empero, cifras muy similares de seropositividad con el uso del mismo cELISA comercial, fueron obtenidas en trabajos realizados en

ovejas de distintas regiones de Turkia (Yazici et al., 2012). Probablemente algunas condiciones epidemiológicas y factores de bioseguridad son análogos entre esas regiones y las aquí analizadas de tal suerte que contribuyen a la similitud de los parámetros obtenidos. En otras áreas del mundo como Namibia y España reportaron porcentajes entre 4.6 – 40% de seropositividad en hatos de pequeños rumiantes (Depner et al., 1991; Fernandez-Aguilar et al., 2016) lo cual está por debajo de los datos obtenidos en el presente estudio (55.6 – 100%), estas observaciones sugieren los parámetros puede variar según las medidas de control y sanidad de las diferentes áreas, además de la presencia de animales Pi y otros factores de riesgo que tengan un rol importante en la dispersión de los *Pestivirus*. Por el contrario, diversos investigadores han determinado prevalencias regionales que pueden alcanzar hasta un 70%, mientras que por hato rangos relativamente alto de entre 47.6 - 62.7% y además de una seroprevalencia individual de 16.3 a 29.4 % en ovinos (Graham et al., 2001; Krametter-Frotscher et al., 2007; Schleiner, Krametter-Frotscher, et al., 2006). Estos datos concuerdan con la presente investigación, con diferencias a nivel de hato ya que en nuestro caso se encuentran entre un 61 – 90 % de seropositividad por hato y a nivel individual de hasta 40% en el caso ovino y un 29.7% en caprinos. Por otra parte, es de notar que los valores encontrados por otros investigadores (Graham et al., 2001; Krametter-Frotscher et al., 2007; Schleiner, Krametter-Frotscher, et al., 2006) están centrados en la especie ovina la cual aparentemente, y acorde a los datos serológicos, muestra una mayor susceptibilidad a *Pestivirus* comparadas con las especie caprina. Al respecto, no

hay estudios que señalen si existen una resistencia genética natural en caprinos a infectarse por *Pestivirus*, o si solo ciertas especies o variantes de *Pestivirus* tienen la habilidad para lograrlo o si estas observaciones, de una relativa baja seropositividad en caprinos, se deban a factores locales de interacción entre las especies animales o solo es debido al efecto del diseño de los estudios. De todos modos, los parámetros serológicos obtenidos son de importancia y pueden significar que existe muy poco control o manejo no apropiado en estas especies animales, lo cual posibilita que las infecciones por estos virus persistan debido al escaso o nulo conocimiento de su presencia en los pequeños rumiantes. Krametter-Froetscher et al., en el 2016 reportaron una seroprevalencia (11.5%) relativamente baja contra *Pestivirus* en caprinos que mantenían contacto con ovinos y bovinos en cuatro regiones de Austria (Krametter-Froetscher et al., 2006). No obstante, en estas poblaciones mixtas, la presencia de bovinos en el área y la presencia de anticuerpos contra *Pestivirus* en caprinos fue altamente significativa ( $P < 0.05$ ) sugiriendo una asociación o interacción entre ambas especies (Krametter- Froetscher et al., 2006). Basado en estas observaciones y acorde a los datos encontrados en el presente trabajo, con una seroprevalencia de 29.7% en caprinos, y a la posible intensa interacción entre caprinos y otros rumiantes (particularmente bovinos y ovinos); nos sugiere fuertemente que, la intensa actividad de seropositividad en caprinos se debe a la existencia de bovinos infectados en el área lo cual a su vez hace sospechar de la transmisión inter-especies y su persistencia en estas poblaciones de rumiantes.

Acorde a los datos obtenidos la presencia de *Pestivirus* en ovinos de 44.36 % es mayor que en caprinos 29.71 % (Tabla 5), esto describe que los ovinos presentan 2.36  $CI_{95}$  (1.42-2.51) más probabilidades de estar enfermos que los caprinos. Por lo que se considera que los ovinos son un factor de riesgo, ( $P < 0.05$ ) indicando que estos son más propensos a presentar enfermedad por *Pestivirus*. También por consiguiente existen 5.96 ( $CI_{95\%}$  2.24 – 15.83), más probabilidades de infecciones en hatos ovinos que caprinos.

Por consiguiente, en una comparación entre los distritos de desarrollo rural de los individuos expuestos (Anáhuac) presentan entre 1.05 y 12.34 más probabilidades de estar enfermos por una enfermedad causada por *Pestivirus* que los animales en Apodaca. Considerando a que la zona de Anáhuac es un factor de riesgo. ( $P < 0.05$ ) Esa por ser una región con un gran movimiento de ganado ovino y caprino tanto de compra externa como interna por parte de los productores, además del contacto con fauna silvestre como venados y cerdos salvajes. Crean las condiciones adecuadas, para la diseminación del virus dentro de las distintas explotaciones pecuarias, además de que mucha signología y la enfermedad en ovinos y caprinos es poco tomada en cuenta.

En el caso de la comparación entre Anáhuac y Montemorelos (Tabla 7), debido a que existe una gran probabilidad de contraer un pestivirus en estas áreas la diferencia es no significativa  $P > 0.05$ , esto indicando que el resultado obtenido para el Odds Ratio no es significativo, ya que la unidad está dentro del intervalo de confianza calculado (usando la aproximación logarítmica).

Al hacer la comparación entre Anáhuac y Galeana (Tabla 7)  $P > 0.05$  el resultado obtenido para el Odds Ratio no es significativo, ya que la unidad está dentro del intervalo de confianza calculado (usando la aproximación logarítmica). Esto indica que debido a la alta seroprevalencia en ambos lugares, la probabilidad de contraer un *Pestivirus* es la misma, esto atribuye al igual que en Montemorelos, estas tres áreas debido a la alta compra de animales o el desconocimiento del agente etiológico crea que estas regiones sean de alta prevalencia.

Montemorelos al ser un lugar que posee una alta seropositividad contra *Pestivirus* (Tabla 7), hace más susceptibles a las dos especies animales a contraer el agente infeccioso esto se debe a que los productores tienden a pastar en los mismos lugares, al combinar condiciones las climáticas adecuadas y animales susceptibles al virus causa un ambiente adecuado para la supervivencia de los *Pestivirus*. Creando la repetición de un ciclo de reinfección, también pueden darse los casos de animales pl, los cuales diseminan más el virus a otras áreas de pastoreo, causando una exposición constante al agente etiológico en diferentes áreas logrando la infección de animales susceptibles, que acaban de ser incorporados a la explotación pecuaria y no habían estado expuestos al virus presentándose la enfermedad.

Montemorelos y Galeana (Tabla 7), posee las mismas condiciones para el contagio con *Pestivirus*, el resultado obtenido para el Odds Ratio no es significativo, ya que la unidad está dentro del intervalo de confianza calculado (usando la aproximación logarítmica). esto quiere decir que con una  $P > 0.05$ , ambos distritos poseen una seropositividad alta lo cual causa que cualquier

animal de cualquier de las dos especies del estudio puedan contagiarse y presentar signología de la enfermedad.

Estos datos refieren a que las áreas de mayor seroprevalencia de *Pestivirus* siendo Anáhuac, Montemorelos y Galeana, existe una gran circulación de este tipo de virus, infectando tanto a ovinos como caprinos, recalando en que los ovinos tienden a ser más susceptibles a enfermedades causadas por *Pestivirus*, estas regiones son más propensas al nacimiento de animales persistentemente infectados, creando que el virus persista en las distintas explotaciones pecuarias, siendo así un problema mayor para su eliminación, tanto en el estado de Nuevo León como México en general.

Estudios previos han señalado la circulación y factores de riesgo para el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) en hatos del sistema Vaca-Cría del Noreste de México (Domínguez Díaz & Díaz, 2009), no obstante se carece de información de la presencia o epidemiología de *Pestivirus* en rumiantes pequeños de Nuevo León e incluso en México. Dentro de los factores de riesgo tomados en cuenta dentro del estudio se determinaron por medio de una encuesta realizada a los productores y dueños de las explotaciones pecuarias, dentro de los factores que más destacaron se encontraron: que las regiones poseen 3.00 CI<sub>95</sub> (1.74 - 5.17) más riesgos de contraer *Pestivirus* en Montemorelos, Galena con 2.27 CI<sub>95</sub> (1.32-3.93) y Anáhuac con 2.04 CI<sub>95</sub> (1.16-3.57), esto debido a la alta seroprevalencia detectada en el estudio (Tabla 8). El hecho de que muchas explotaciones que poseían un gran tamaño de hato estos poseen mayor posibilidad de contraer *Pestivirus* que no los hatos pequeños, esto para ambas especies determinado

por chi-cuadrado (Tabla 8) este resultado fue similar como (Cuttance & Cuttance, 2014; Jarvinen & O'Connor, 2014) demostraron, en que hatos de mayor tamaño influyen más que los hatos pequeños, al incluir los datos con la razón de momios se demostró un resultado no significativo, dando por ende que no había relación entre el tamaño de hato y la presencia de *Pestivirus*. Esto no significa el descartar este factor, ya que existen otros elementos que pueden afectar el hato, como el contacto con otras especies animales, entre otros (Almeida et al., 2013).

Entre las dos especies estudiadas se determinó que los ovinos son 2.36 (CI<sub>95%</sub> 1.28-4.35) más susceptibles que caprinos a enfermedades por *Pestivirus* (Tabla 8), esto puede deberse a la gran diversidad de receptores que interactúan con las diferentes cepas de *Pestivirus* asociados a ovinos, provocando que esta especie resulte de mayor susceptibilidad que los caprinos. Por otro lado, también se determinó en nuestro estudio que el tamaño de hato no es un factor que influye en las infecciones por dicho virus.

Según el tipo de explotación la industria lechera se ve más afectada con 2.36 más probabilidades de estar infectados por *Pestivirus* (Tabla 8). Esto podría deberse al gran contacto entre animales, pero es tomada como un factor que aunado a otro de los mencionados anteriormente ya que fueron poco significativas al estudio ( $P > 0.05$ )

La presencia de otras especies animales en el área causa una mayor circulación de *Pestivirus* entre los hatos caprinos y ovinos, pero no se tomó en cuenta la distancia entre un hato y otro, pero según (Loeffen, van Beuningen, Quak, &

Elbers, 2009) determinaron que en un radio de 3 km. y un tamaño de hato mayor a 60 animales tiende a aumentar la probabilidad de animales seropositivos dentro del hato. Nuestro estudio nos demostró que la presencia de otros animales causa un 1.46 (CI<sub>95%</sub> 0.93-2.30) más probabilidades de las infecciones por *Pestivirus* estén presentes en las explotaciones ovinas y caprinas (Tabla 8). Pero este es un factor que al entrar en interacción con otros factores tienden a incidir aún más en la circulación de *Pestivirus*, pero no es un factor que afecte directamente. (P>0.05)

Se observó al mismo tiempo que la presencia de otras especies animales y el compartir pasturas (Saa et al., 2012; Schleiner, Krametter-Frobscher, et al., 2006) indicó ser un factor de riesgo, debido a que estos alimentos al estar contaminados por *Pestivirus* contraen las infecciones animales susceptibles perpetuando el ciclo por más tiempo. Un factor importante en la prevención de las infecciones por *Pestivirus* es la utilización de cuarentenas, en nuestro caso concede un factor de protección al hato, debido a que reduce la cantidad de animales susceptibles al virus, pero esto solo se da en caso de que estos animales posean anticuerpos ante el antígeno. El hecho de no realizarse una cuarentena concede a esta variable como un factor de riesgo como lo encontró (Talafha, Hirche, Ababneh, & Al-Majali, 2009).

Un elemento determinante en la circulación de *Pestivirus* es la introducción y compra de nuevos animales al hato, al igual que estar en contacto con otros animales infectados o no infectados de nuevos hatos concordando en estudios realizados previamente por varios investigadores (Almeida et al., 2013; Solis-

Calderon, Segura-Correa, & Segura-Correa, 2005; Valle, Martin, Tremblay, & Bateman, 1999). En el presente estudio se determinó que la introducción de animales con anticuerpos poseen 0.60 (CI<sub>95%</sub> 0.39-0.94) mayores probabilidades a que actúen como un factor protectorio de *Pestivirus* (Tabla 8), esto en específico de animales los cuales posean anticuerpos contra el virus, lo cual aportará una mayor inmunidad del hato y en contra de infecciones, esto no refiere a que la introducción de cualquier animal al hato confiera un factor protectorio, ya que aún pueden presentarse animales pl, causantes de la diseminación del virus, para esto siempre debe de tomarse en cuenta la bioseguridad y las medidas de cuarentena necesarias.

Dentro de las medidas preventivas en los ranchos destaca el factor protectorio de la cuarentena con 0.58 (CI<sub>95%</sub> 0.32-1.06) más probabilidades de que el utilizar esta medida de bioseguridad las infecciones por *Pestivirus* disminuyan dentro de los hatos caprinos y ovinos (Tabla 8). El movimiento por parte de veterinarios o de los visitantes mostró un 1.89 (CI<sub>95%</sub> 1.24-2.87) (Tabla 8) más probabilidades de adquirir infecciones por *Pestivirus* dentro de los ranchos esto debiéndose a la resistencia del virus en ser estable en condiciones estables y la movilización por parte del patógeno a través de fómites como ropa, equipo, calzado e inclusive en el transporte utilizado por el personal del establecimiento o por el médico veterinario. Observaciones similares previas fueron realizadas por (Almeida et al., 2013; Talafha et al., 2009), determinaron que la movilización de médicos veterinarios y personal entre los ranchos es un factor en la diseminación y transmisión de *Pestivirus* entre las diferentes especies animales susceptibles y

que además la no aplicación de cuarentena propicia las condiciones necesarias para la infección en diversos hatos (Almeida et al., 2013; Talafha et al., 2009); por lo que es importante recalcar la importancia e implementación de medidas de bioseguridad como parte integral de los procesos de protección contra *Pestivirus* o cualquier otro tipo de agente infeccioso (Fernandez et al.; 2016). En el presente trabajo se determinó que es altamente sugerente que a través de la compra de animales o la introducción de nuevos animales a sus respectivos hatos sin pruebas previas y sin cuarentena facilita en gran medida la circulación de los *Pestivirus* hacia y entre los rebaños. Además de que prácticamente ni uno solo de los propietarios aplican ó cumplen con las medidas minima necesarias de las normas de cuarentena en sus majadas, evidenciando por un lado que la falta de conocimiento de la enfermedad y por otro que la nula aplicación de protocolos de bioseguridad pueden ser causas directas a la circulación de *Pestivirus* entre las poblaciones de ovinos y caprinos, y probablemente en otras especies, de Nuevo León como lo han sugerido investigaciones previas en otras partes del mundo (Nelson et al., 2016; Wolff et al 2016). Al respecto, y con el fin aminorar los efectos negativos de estos virus en la producción, probablemente sea prioritario capacitar a los propietarios de los ranchos de estas especies en temas de bioseguridad, vacunación, descontaminación, cuarentena y vías de ingreso de estas infecciones a sus majadas.

A partir de cocteles de plasma de animales obtenidos de hatos con alta seropositividad se ensayaron diferentes RT-PCR'S con el usos de oligonucleótidos, diseñados en el presente estudio y, dirigidos para

potencialmente unirse a regiones genómicas conservadas de los *Pestivirus* (Meyers & Thiel, 1996). Inconsistencias en los resultados (datos no mostrados), con el uso de diferentes combinaciones de estos oligonucleotidos, fueron obtenidos por lo que no fue posible amplificar las regiones genómicas seleccionadas del genoma pestiviral. Probablemente, algunos factores como variaciones genéticas (Becher et al., 2003; Paton, 1995; Vilcek, Durkovic, Kolesarova, & Paton, 2005) de las posibles cepas circulantes en esta área, la dilución de las muestras y bajas concentraciones de las partículas virales (Strong et al., 2015) o reconocimiento serológico asociado a complemento (Alzamel, Bayrou, Decreux, & Desmecht; Krey et al., 2006) pudieron haber contribuidos a estos resultados. No obstante, de un reducido número de muestras se logró la amplificación de parte la región conservada 5´UTR de *Pestivirus* mediante RT-PCR / PCR anidado. Analisis subsecuentes de secuenciación permitió identificar la presencia de secuencias genéticas de *Pestivirus* en ovinos y caprinos. Al respecto, por una parte es necesario considerar que los cocteles de plasma están sujetos al factor de dilución, por lo cual es probable que disminuya la carga viral y por otra parte tambien es factible que exista proporción muy baja de carga viral en sangre / suero (Strong et al., 2015). Tal situación pudo haber afectado la calidad en la detección de las secuencias genéticas por lo que la proporción detectando disminuye en la totalidad de secuencias genéticas de todas las muestras analizadas en el presente trabajo. Estudios similares previos han detectado un relativo alto numero de pools positivos por medio de RT-PCR (Smith, Sanderson, Walz, & Givens, 2008). Por otra parte, Sasha y colaboradores

en el 2014 concuerdan que cocteles de entre 5-25 muestras pueden interpretarse como positivos o negativos, considerando el tamaño de las muestras, tamaño de hato, prevalencia, error y el nivel de confianza. (Lanyon, Anderson, & Reichel, 2014)

Los análisis subsecuentes de secuenciación de tres muestras, denominadas como Linares, Galeana y Anáhuac (Figura 4), permitió reconocer que las secuencias mostraron una homología relativamente muy alta con cepas clasificadas dentro de BVDV-1. Lo anterior, surgió después de la realización de alineamientos múltiples con diversas cepas de *Pestivirus* reportadas en el GenBank®. (Esmaelizad & Kargar-Moakhar, 2014), determinaron que la cepa iraní y la cepa citopática de Australia BVDV-1c son similares lo que indicó un ancestro en común, esto contrasta como lo encontrado en el presente estudio que determinó que la cepa encontrada en las muestras corresponden en un 99% a BVDV-1 aislado 9, similar a la aislada en Irán (Esmaelizad & Kargar-Moakhar, 2014). Estas observaciones, sugieren que diversos factores como la importación de animales o semen infectado provenientes de ganado bovino a la región analizada y la subsecuente interacción con pequeños rumiantes pudo en determinado momento ser la causa de la potencial diseminación de *Pestivirus* hacia y entre pequeños rumiantes. Esta observación es reforzada por los datos de factores de riesgo obtenidos en el presente trabajo dentro de los cuales la nula bioseguridad, la mezcla de animales de distintas especies, el desconocimiento de la presencia de la enfermedad estableció condiciones favorables para la

circulación y mantenimiento de este Pestivirus (Marco et al., 2009; Niskanen & Lindberg, 2003),

Hasta donde se sabe, este es el primer reporte de la presencia *Pestivirus* en rumiantes pequeños en México. Los resultados serológicos y moleculares sugieren fuertemente la presencia y alta circulación de *Pestivirus* en las especies ovina y caprina en esta parte del país. Acorde a lo anterior; es necesario realizar estudios posteriores específicos para confirmar y conocer el papel que podrían estar desempeñando estos agentes virales en la salud y productividad en estas y otras especies de los rumiantes susceptibles. Si los altos índices de seroprevalencia y el genotipo viral detectados reflejan lo que sucede en otras regiones de México permanece por esclarecerse a fin de diseñar protocolos de control y erradicación.

## 8 CONCLUSIONES

Se encontró un alto índice de seropositividad contra *Pestivirus* en hatos caprinos y ovinos de Nuevo León, además de que se encontraron secuencias genéticas 5' UTR en 5 muestras, se determinó que cepas agrupadas dentro del BVDV-1 son las que circulan entre pequeños rumiantes. Dadas las características del comportamiento biológico de estos virus en la naturaleza es probable que se encuentren circulando en otras especies susceptibles. (Ávalos Ramírez, 2007; Ávalos Ramírez et al., 2010) Aparentemente, factores de bioseguridad, manejo por parte del productor y personal de la explotación, concurren para observar estos altos índices de seropositividad. Todos los Distritos de Desarrollo Rural del estado resultaron cuando menos con un hato seropositivo. Es probable que el comercio de animales sin realizar pruebas, el desconocimiento de esta infección, la mezcla de animales y la falta de medidas de bioseguridad contribuyan a la alta seropositividad observada. No se descarta que, en el estado, y acorde a las cifras obtenidas, ocurra la presencia de animales persistentemente infectados, esto deberá de realizarse por medio de un estudio más específico hacia explotaciones observando signología específica a *Pestivirus* además de realizar pruebas más específicas identificando la especie de este virus que este circulando confirmando la presencia del virus en el área noreste de México.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Latif, A., Goyal, S., Chander, Y., Abdel-Moneim, A., Tamam, S., & Madbouly, H. (2013). Isolation and molecular characterisation of a pestivirus from goats in Egypt. *Acta Veterinaria Hungarica*, *61*(2), 270-280.

Abe, Y., Tamura, T., Torii, S., Wakamori, S., Nagai, M., Mitsuhashi, K., . . . Sakoda, Y. (2016). Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *78*(1), 61-70. doi:10.1292/jvms.15-0186

Aberle, D., Muhle-Goll, C., Burck, J., Wolf, M., Reisser, S., Luy, B., . . . Meyers, G. (2014). Structure of the membrane anchor of pestivirus glycoprotein E(rns), a long tilted amphipathic helix. *PLoS Pathog*, *10*(2), e1003973. doi:10.1371/journal.ppat.1003973 PPATHOGENS-D-13-01809 [pii]

Aguirre, I., Fuentes, R., & Celedón, M. (2014). Genotypic characterization of Chilean llama (*Lama glama*) and alpaca (*Vicugna pacos*) pestivirus isolates. *Veterinary microbiology*, *168*(2), 312-317.

Ali, Y., Intisar, K., Ishag, O., Baraa, A., Haj, M., Taha, K., . . . Elfahal, A. (2013). Seroprevalence of pestivirus in small ruminants in Sudan. *African Journal of Microbiology Research*, *7*(31), 3988-3991.

Almeida, L. L., Miranda, I. C. S., Hein, H. E., Neto, W. S., Costa, E. F., Marks, F. S., . . . Corbellini, L. G. (2013). Herd-level risk factors for bovine viral diarrhea

virus infection in dairy herds from Southern Brazil. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 901-907. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.08.009>

Alzamel, N., Bayrou, C., Decreux, A., & Desmecht, D. Soluble forms of CD46 are detected in *Bos taurus* plasma and neutralize BVDV, the bovine pestivirus. (1878-1667 (Electronic)).

Avalos Ramirez, R. (2002). *Phylogenetische Analysen und antigenetische Verwandtschaft von Pestiviren*. (Inaugural-Dissertation), Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen.

Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.-J., & Becher, P. (2001). Evidence for the Presence of Two Novel Pestivirus Species. *Virology*, 286(2), 456-465. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/viro.2001.1001>

Bachofen, C., Bollinger, B., Peterhans, E., Stalder, H., & Schweizer, M. (2013). Diagnostic gap in Bovine viral diarrhoea virus serology during the periparturient period in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(5), 655-661. doi:10.1177/1040638713501172

Bachofen, C., Grant, D. M., Willoughby, K., Zadoks, R. N., Dagleish, M. P., & Russell, G. C. (2014). Experimental infection of rabbits with bovine viral diarrhoea virus by a natural route of exposure. *Veterinary Research*, 45(1), 34-34. doi:10.1186/1297-9716-45-34

Bachofen, C., Vogt, H.-R., Stalder, H., Mathys, T., Zanoni, R., Hilbe, M., . . . Peterhans, E. (2013). Persistent infections after natural transmission of bovine

viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. *Veterinary Research*, 44(1), 32-32. doi:10.1186/1297-9716-44-32

Bauermann, F. V., Falkenberg, S. M., Decaro, N., Flores, E. F., & Ridpath, J. F. (2015). Experimental infection of calves, sheep, goats and pigs with HoBi-like viruses by direct inoculation or exposure to persistently infected calves. *Veterinary Microbiology*, 181(3-4), 289-293. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.011

Bauermann, F. V., Flores, E. F., & Ridpath, J. F. (2012). Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: Possible impacts on diagnosis and control. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(2), 253-261. doi:10.1177/1040638711435144

Bauermann, F. V., Ridpath, J. F., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2013). HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(1), 6-15. doi:10.1177/1040638712473103

Becher, P., Avalos Ramirez, R., Orlich, M., Cedillo Rosales, S., König, M., Schweizer, M., . . . Thiel, H. J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, 311(1), 96-104.

Becher, P., Avalos Ramirez, R., Orlich, M., Cedillo Rosales, S., König, M., Schweizer, M., . . . Thiel, H.-J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, 311(1), 96-104. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00192-2

Becher, P., Fischer, N., Grundhoff, A., Stalder, H., Schweizer, M., & Postel, A. (2014). Complete Genome Sequence of Bovine Pestivirus Strain PG-2, a Second Member of the Tentative Pestivirus Species Giraffe. *Genome Announc*, 2(3). doi:genomeA.00376-14 [pii] 10.1128/genomeA.00376-14

Becher, P., Orlich, M., & Thiel, H. J. (1998). Ribosomal S27a coding sequences upstream of ubiquitin coding sequences in the genome of a pestivirus. *J Virol*, 72(11), 8697-8704.

Berriatua, E., Barandika, J. F., Aduriz, G., Hurtado, A., Estevez, L., Atxaerandio, R., & Garcia-Perez, A. L. (2006). Flock-prevalence of border disease virus infection in Basque dairy-sheep estimated by bulk-tank milk analysis. *Vet Microbiol*, 118(1-2), 37-46.

Booth, R. E., Thomas, C. J., El-Attar, L. M. R., Gunn, G., & Brownlie, J. (2013). A phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from six different regions of the UK and links to animal movement data. *Veterinary Research*, 44(1), 43-43. doi:10.1186/1297-9716-44-43

Brar, J. S., Johnson, D. W., Muscoplat, C. C., Shope, R. E., Jr., & Meiske, J. C. (1978). Maternal immunity to infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea viruses: duration and effect on vaccination in young calves. *Am J Vet Res*, 39(2), 241-244.

Braun, U., Bachofen, C., Buchi, R., Hassig, M., & Peterhans, E. (2013). Infection of cattle with Border disease virus by sheep on communal alpine pastures. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 155(2), 123-128. doi:10.1024/0036-7281/a000428

Braun, U., Bachofen, C., Schenk, B., Hassig, M., & Peterhans, E. (2013). Investigation of border disease and bovine virus diarrhoea in sheep from 76 mixed cattle and sheep farms in eastern Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 155(5), 293-298. doi:10.1024/0036-7281/a000460

Brown, J., Fauquet, C., Bridton, R., Zerbini, M., Moriones, E., Navas-Castillo, J., . . . Lefkowitz, E. (2012). Virus Taxonomy—Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *King, AMQ, Lefkowitz, E., Adams, MJ, Carstens, EB, Eds*, 351373.

Bruschke, C. J., Hulst, M. M., Moormann, R. J., van Rijn, P. A., & van Oirschot, J. T. (1997). Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol*, 71(9), 6692-6696.

Byers, S. R., Evermann, J. F., Bradway, D. S., Grimm, A. L., Ridpath, J. F., Parish, S. M., . . . Barrington, G. M. (2011). The effects of exposure of susceptible alpacas to alpacas persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *The Canadian Veterinary Journal*, 52(3), 263-271.

Cabezón, O., Rosell, R., Velarde, R., Mentaberre, G., Casas-Díaz, E., Lavín, S., & Marco, I. (2010). Border Disease Virus Shedding and Detection in Naturally Infected Pyrenean Chamois (*Rupicapra Pyrenaica*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(5), 744-747. doi:10.1177/104063871002200514

Cabezón, O., Velarde, R., Mentaberre, G., Fernández-Sirera, L., Casas-Díaz, E., López-Olvera, J., . . . Marco, I. (2011). Experimental infection with chamois border disease virus causes long-lasting viraemia and disease in Pyrenean chamois

(Rupicapra pyrenaica). *Journal of General Virology*, 92(11), 2494-2501.  
doi:10.1099/vir.0.034595-0

Callens, N., Brügger, B., Bonnafous, P., Drobecq, H., Gerl, M. J., Krey, T., . . . Rouillé, Y. (2016). Morphology and Molecular Composition of Purified Bovine Viral Diarrhea Virus Envelope. *PLOS Pathogens*, 12(3), e1005476.  
doi:10.1371/journal.ppat.1005476

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 421.

Casaubon, J., Vogt, H.-R., Stalder, H., Hug, C., & Ryser-Degiorgis, M.-P. (2012). Bovine viral diarrhoea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Veterinary Research*, 8, 204-204. doi:10.1186/1746-6148-8-204

Cedillo Rosales, S. (2004). *Charakterisierung ruminanter Pestiviren mittels Polymerasekettenreaktion und monoklonaler Antikörper*. DVG Service, Giessen.

Cedillo Rosales, S. (2004). *Charakterisierung ruminanter Pestiviren mittels Polymerasekettenreaktion und monoklonaler Antikörper*. (Doktorarbeit), Justus-Liebig Universität Giessen, Giessen, Deutschland.

Celedón, M., Sandoval, A., Droguett, J., Calfio, R., Ascencio, L., Pizarro, J., & Navarro, C. (2001). Pesquisa de anticuerpos seroneutralizantes para pestivirus y herpesvirus en ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos de Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 33, 165-172.

Colom-Cadena, A., Cabezon, O., Rosell, R., Fernandez-Aguilar, X., Blanch-Lazaro, B., Tetas, E., . . . Marco, I. (2016). The European hare (*Lepus europaeus*) as a potential wild reservoir for ruminant pestiviruses. (1873-1716 (Electronic)).

Corbett, E. M., Grooms, D. L., Bolin, S. R., Bartlett, B., & Grotelueschen, D. M. (2011). Use of sentinel serology in a Bovine viral diarrhoea virus eradication program. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(3), 511-515. doi:10.1177/1040638711403412

Curti, E., & Jaeger, J. (2013). Residues Arg283, Arg285, and Ile287 in the Nucleotide Binding Pocket of Bovine Viral Diarrhoea Virus NS5B RNA Polymerase Affect Catalysis and Fidelity. *Journal of Virology*, 87(1), 199-207. doi:10.1128/jvi.06968-11

Cuttance, W. G., & Cuttance, E. L. (2014). Analysis of individual farm investigations into bovine viral diarrhoea in beef herds in the North Island of New Zealand. *N Z Vet J*, 62(6), 338-342. doi:10.1080/00480169.2014.928925

Czopowicz, M., Kaba, J., Schirrmeier, H., Bagnicka, E., Szalus-Jordanow, O., Nowicki, M., . . . Frymus, T. (2011). Serological evidence for BVDV-1 infection in goats in Poland - short communication. *Acta Vet Hung*, 59(3), 399-404. doi:10.1556/AVet.2011.022

de Blas, I., Ruiz-Zarzuola I, & A., V. (2006). WinEpi : Working in epidemiology. An online epidemiological tool. In *ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, .

Decaro, N., Lanave, G., Lucente, M. S., Mari, V., Varello, K., Losurdo, M., . . . Buonavoglia, C. (2014). Mucosal disease-like syndrome in a calf persistently infected by Hobi-like pestivirus. *J Clin Microbiol*, *52*(8), 2946-2954. doi:JCM.00986-14 [pii] 10.1128/JCM.00986-14

Decaro, N., Lucente, M. S., Lanave, G., Gargano, P., Larocca, V., Losurdo, M., . . . Elia, G. (2016). Evidence for Circulation of Bovine Viral Diarrhoea Virus Type 2c in Ruminants in Southern Italy. (1865-1682 (Electronic)). doi:LID - 10.1111/tbed.12592 [doi]

Decaro, N., Mari, V., Pinto, P., Lucente, M. S., Sciarretta, R., Cirone, F., . . . Buonavoglia, C. (2012). Hobi-like pestivirus: both biotypes isolated from a diseased animal. *J Gen Virol*, *93*(Pt 9), 1976-1983. doi:vir.0.044552-0 [pii] 10.1099/vir.0.044552-0

Depner, K., Hubschle, O. J., & Liess, B. (1991). Prevalence of ruminant pestivirus infections in Namibia. *Onderstepoort J Vet Res*, *58*(2), 107-109.

Dias, N. L., Fonseca Júnior, A. A., Oliveira, A. M., Sales, É. B., Alves, B. R. C., Dorella, F. A., & Camargos, M. F. (2014). Validation of a Real Time PCR for Classical Swine Fever Diagnosis. *Veterinary Medicine International*, *2014*, 171235. doi:10.1155/2014/171235

Domínguez Díaz, D., & Díaz, D. D. (2009). *Prevalencia y factores de riesgo asociados al virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBRV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), leptospira spp. y neospora caninum, en hatos con sistema vaca-cría del estado de Nuevo León*. Retrieved from

Dubovi, E. J. (2013). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41(1), 8-13.

Eiras, C., Arnaiz, I., Sanjuán, M. L., Yus, E., & Diéguez, F. J. (2012). Bovine viral diarrhoea virus : Correlation between herd seroprevalence and bulk tank milk antibody levels using 4 commercial immunoassays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(3), 549-553. doi:10.1177/1040638712440984

El Omari, K., Iourin, O., Harlos, K., Grimes, J. M., & Stuart, D. I. (2013). Structure of a pestivirus envelope glycoprotein E2 clarifies its role in cell entry. *Cell Rep*, 3(1), 30-35. doi:S2211-1247(12)00424-X [pii] 10.1016/j.celrep.2012.12.001

Ellis, J., West, K., Cortese, V., Konoby, C., & Weigel, D. (2001). Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against bovine viral diarrhoea virus type II in young calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(3), 351-356. doi:10.2460/javma.2001.219.351

Esmaelizad, M., & Kargar-Moakhar, R. (2014). Phylogenetic study on the 5'-untranslated region of bovine viral diarrhoea virus isolates from Iran. *Vet Ital*, 50(3), 213-218. doi:10.12834/VetIt.78.249.2

Fernandez-Aguilar, X., Lopez-Olvera, J. R., Marco, I., Rosell, R., Colom-Cadena, A., Soto-Heras, S., . . . Cabezon, O. (2016). Pestivirus in alpine wild ruminants and sympatric livestock from the Cantabrian Mountains, Spain. (2042-7670 (Electronic)).

Fernandez-Sirera, L., Cabezon, O., Rossi, L., Meneguz, P. G., Rosell, R., Casas-Diaz, E., . . . Marco, I. (2011). Investigations of pestivirus infection in wild Caprinae in Europe. *Vet Rec*, *169*(1), 15. doi:vr.d1831 [pii] 10.1136/vr.d1831

Fernandez-Sirera, L., Casaubon, J., Ryser-Degiorgis, M. P., Vogt, H. R., Marco, I., Peterhans, E., & Bachofen, C. (2014). Specificity of pestivirus antibodies in wild ruminants from Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*, *156*(7), 349-351. doi:M348L261J61W4W02 [pii] 10.1024/0036-7281/a000606

Fernández-Sirera, L., Cabezón, O., Allepuz, A., Rosell, R., Riquelme, C., Serrano, E., . . . Marco, I. (2012). Two Different Epidemiological Scenarios of Border Disease in the Populations of Pyrenean chamois (*Rupicapra p. pyrenaica*) after the First Disease Outbreaks. *PLoS ONE*, *7*(12), e51031. doi:10.1371/journal.pone.0051031

Friis, M. B., Rasmussen, T. B., & Belsham, G. J. (2012). Modulation of Translation Initiation Efficiency in Classical Swine Fever Virus. *Journal of Virology*, *86*(16), 8681-8692. doi:10.1128/JVI.00346-12

Giammarioli, M., Rossi, E., Casciari, C., Bazzucchi, M., Torresi, C., & De Mia, G. M. (2015). Genetic characterization of border disease virus (BDV) isolates from small ruminants in Italy. *Virus Genes*, *50*(2), 321-324. doi:10.1007/s11262-014-1165-6

Giangaspero, M., Apicella, C., & Harasawa, R. (2013). Numerical taxonomy of the genus Pestivirus: new software for genotyping based on the palindromic

nucleotide substitutions method. *J Virol Methods*, 192(1-2), 59-67. doi:S0166-0934(13)00178-X [pii] 10.1016/j.jviromet.2013.04.023

Gladue, D. P., Holinka, L. G., Largo, E., Fernandez Sainz, I., Carrillo, C., O'Donnell, V., . . . Borca, M. V. (2012). Classical Swine Fever Virus p7 Protein Is a Viroporin Involved in Virulence in Swine. *Journal of Virology*, 86(12), 6778-6791. doi:10.1128/jvi.00560-12

Gottipati, K., Acholi, S., Ruggli, N., & Choi, K. H. (2014). Autocatalytic activity and substrate specificity of the pestivirus N-terminal protease Npro. *Virology*, 452-453, 303-309. doi:S0042-6822(14)00039-7 [pii] 10.1016/j.virol.2014.01.026

Graham, D. A., Calvert, V., German, A., & McCullough, S. J. (2001). Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. *Vet Rec*, 148(3), 69-72.

Hyera, J. M., Liess, B., & Frey, H. R. (1991). Bovine viral diarrhoea virus infection in cattle, sheep and goats in northern Tanzania. *Trop Anim Health Prod*, 23(2), 83-94.

INEGI. (2012). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *INEGI*.

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

Isken, O., Langerwisch, U., Schönherr, R., Lamp, B., Schröder, K., Duden, R., . . . Tautz, N. (2014). Functional Characterization of Bovine Viral Diarrhoea Virus

Nonstructural Protein 5A by Reverse Genetic Analysis and Live Cell Imaging. *Journal of Virology*, 88(1), 82-98. doi:10.1128/jvi.01957-13

Jarvinen, J. A., & O'Connor, A. M. (2014). Seroprevalence of bovine viral diarrhea virus in alpacas in the United States and assessment of risk factors for exposure, 2006-2007. *J Am Vet Med Assoc*, 245(6), 696-703. doi:10.2460/javma.245.6.696

Jefferson, M., Donaszi-Ivanov, A., Pollen, S., Dalmay, T., Saalbach, G., & Powell, P. P. (2014). Host Factors That Interact with the Pestivirus N-Terminal Protease, Npro, Are Components of the Ribonucleoprotein Complex. *Journal of Virology*, 88(18), 10340-10353. doi:10.1128/jvi.00984-14

Jefferson, M., Donaszi-Ivanov, A., Pollen, S., Dalmay, T., Saalbach, G., & Powell, P. P. (2014). Host factors that interact with the pestivirus N-terminal protease, Npro, are components of the ribonucleoprotein complex. *J Virol*, 88(18), 10340-10353. doi:JVI.00984-14 [pii] 10.1128/JVI.00984-14

Juliá, S., Craig, M., Jiménez, L., Pinto, G., & Weber, E. (2009). First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Preventive veterinary medicine*, 90(3), 274-277.

Kaiser, V., Nebel, L., Schupbach-Regula, G., Zanoni, R. G., & Schweizer, M. A.-O. h. o. o. (2017). Influence of border disease virus (BDV) on serological surveillance within the bovine virus diarrhea (BVD) eradication program in Switzerland. (1746-6148 (Electronic)).

Kautto, A. H., Alenius, S., Mossing, T., Becher, P., Belak, S., & Larska, M. (2012). Pestivirus and alphaherpesvirus infections in Swedish reindeer (Rangifer

tarandus tarandus L.). In *Vet Microbiol* (Vol. 156, pp. 64-71). Netherlands: A 2011 Elsevier B.V.

King, A. (2012). *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses* (E. Carstens, . et al Ed. Ninth ed. Vol. Ninth). 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK: Elsevier.

Kirchgessner, M. S., Dubovi, E. J., & Whipps, C. M. (2013). Spatial point pattern analyses of Bovine viral diarrhoea virus infection in domestic livestock herds and concomitant seroprevalence in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in New York State, USA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(2), 226-233. doi:10.1177/1040638713479121

Klemens, O., Dubrau, D., & Tautz, N. (2015). Characterization of the determinants of NS2-3-independent virion morphogenesis of pestiviruses. *Journal of virology*, 89(22), 11668-11680.

Koonin, E. V., Dolja, V. V., & Krupovic, M. (2015). Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology*(0). doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.039

Krametter-Froetscher, R., Kohler, H., Benetka, V., Moestl, K., Golja, F., Vilcek, S., & Baumgartner, W. (2007). Influence of communal alpine pasturing on the spread of pestiviruses among sheep and goats in Austria: first identification of border disease virus in Austria. *Zoonoses Public Health*, 54(5), 209-213.

Krametter-Frotscher, R., Loitsch A Fau - Kohler, H., Kohler H Fau - Schleiner, A., Schleiner A Fau - Schiefer, P., Schiefer P Fau - Mostl, K., Mostl K Fau - Golja, F.,

. . . Baumgartner, W. (2007). Serological survey for antibodies against pestiviruses in sheep in Austria. (0042-4900 (Print)).

Krametter-Froetscher, R., Loitsch, A., Kohler, H., Schleiner, A., Schiefer, P., Moestl, K., . . . Baumgartner, W. (2006). Prevalence of antibodies to pestiviruses in goats in Austria. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53(1), 48-50.

Krey, T., Himmelreich, A., Heimann, M., Menge, C., Thiel, H.-J., Maurer, K., & Rümenapf, T. (2006). Function of Bovine CD46 as a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus Is Determined by Complement Control Protein 1. *Journal of Virology*, 80(8), 3912-3922. doi:10.1128/JVI.80.8.3912-3922.2006

Lamp, B., Riedel, C., Roman-Sosa, G., Heimann, M., Jacobi, S., Becher, P., . . . Rümenapf, T. (2011). Biosynthesis of Classical Swine Fever Virus Nonstructural Proteins. *Journal of Virology*, 85(7), 3607-3620. doi:10.1128/JVI.02206-10

Lanyon, S. R., Anderson, M. L., & Reichel, M. P. (2014). Pooling serum to identify cohorts of nonmilking cattle likely to be infected with Bovine viral diarrhoea virus by testing for specific antibodies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(3), 346-353.

Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P., & Brownlie, J. (2014). Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *The Veterinary Journal*, 199(2), 201-209.

Lanyon, S. R., & Reichel, M. P. (2014). Bovine viral diarrhoea virus ('pestivirus') in Australia: to control or not to control? *Aust Vet J*, 92(8), 277-282. doi:10.1111/avj.12208

Largo, E., Gladue, D. P., Huarte, N., Borca, M. V., & Nieva, J. L. (2014). Pore-forming activity of pestivirus p7 in a minimal model system supports genus-specific viroporin function. *Antiviral Res*, *101*, 30-36. doi:S0166-3542(13)00318-5 [pii] 10.1016/j.antiviral.2013.10.015

Lattwein, E., Klemens, O., Schwindt, S., Becher, P., & Tautz, N. (2012). Pestivirus virion morphogenesis in the absence of uncleaved nonstructural protein 2-3. *J Virol*, *86*(1), 427-437. doi:JVI.06133-11 [pii] 10.1128/JVI.06133-11

Li, D., Dong, H., Li, S., Munir, M., Chen, J., Luo, Y., . . . Qiu, H.-J. (2013). Hemoglobin Subunit Beta Interacts with the Capsid Protein and Antagonizes the Growth of Classical Swine Fever Virus. *Journal of Virology*, *87*(10), 5707-5717. doi:10.1128/JVI.03130-12

Li, W., Mao, L., Zhao, Y., Sun, Y., He, K., & Jiang, J. (2013). Detection of border disease virus (BDV) in goat herds suffering diarrhea in eastern China. *Virology Journal*, *10*, 80-80. doi:10.1186/1743-422X-10-80

Li, Y., & Modis, Y. (2014). A novel membrane fusion protein family in Flaviviridae? *Trends Microbiol*, *22*(4), 176-182. doi:S0966-842X(14)00020-1 [pii] 10.1016/j.tim.2014.01.008

Liang, D., Chen, L., Ansari, I. H., Gil, L. H. V. G., Topliff, C. L., Kelling, C. L., & Donis, R. O. (2009). A replicon trans-packaging system reveals the requirement of nonstructural proteins for the assembly of bovine viral diarrhea virus (BVDV) virion. *Virology*, *387*(2), 331-340. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.019

Lindberg, A. L., & Alenius, S. (1999). Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol*, 64(2-3), 197-222.

Lindberg, A. L. E., & Alenius, S. (1999). Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology*, 64(2–3), 197-222. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00270-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00270-3)

Liu, X., Mao, L., Li, W., Yang, L., Zhang, W., Wei, J., & Jiang, J. (2013). Genome Sequence of Border Disease Virus Strain JSLS12-01, Isolated from Sheep in China. *Genome Announcements*, 1(6), e00502-00513. doi:10.1128/genomeA.00502-13

Loeffen, W. L. A., van Beuningen, A., Quak, S., & Elbers, A. R. W. (2009). Seroprevalence and risk factors for the presence of ruminant pestiviruses in the Dutch swine population. *Veterinary Microbiology*, 136(3–4), 240-245. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.011>

Loken, T. (1992). Pestivirus infections in ruminants in Norway. *Rev Sci Tech*, 11(3), 895-899.

Luo, L., Nishi, K., MacLeod, E., Sabara, M. I., Lin, M., Handel, K., & Pasick, J. (2013). Baculovirus Expression and Antigenic Characterization of Classical Swine Fever Virus E2 Proteins. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(2), 143-151. doi:10.1111/j.1865-1682.2012.01327.x

Magaña-Urbina, A., Solorio Rivera, J. L., & Segura-Correa, J. C. (2005). Rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros de la región Cotzio- Téjaro,

Michoacán, México. *Red de Revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Técnica Pecuaria en México.*, 43(1), 27-37.

Mao, L., Li, W., Yang, L., Wang, J., Cheng, S., Wei, Y., . . . Jiang, J. (2016). Primary surveys on molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea virus 1 infecting goats in Jiangsu province, China. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 181. doi:10.1186/s12917-016-0820-7

Marco, I., Cabezon, O., Rosell, R., Fernandez-Sirera, L., Allepuz, A., & Lavin, S. (2011). Retrospective study of pestivirus infection in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) and other ungulates in the Pyrenees (NE Spain). *Vet Microbiol*, 149(1-2), 17-22. doi:S0378-1135(10)00467-0 [pii] 10.1016/j.vetmic.2010.09.032

Marco, I., Rosell R Fau - Cabezon, O., Cabezon O Fau - Beneria, M., Beneria M Fau - Mentaberre, G., Mentaberre G Fau - Casas, E., Casas E Fau - Hurtado, A., . . . Lavin, S. (2009). Serologic and virologic investigations into pestivirus infection in wild and domestic ruminants in the Pyrenees (NE Spain). (1532-2661 (Electronic)).

Martin, C., Duquesne, V., Adam, G., Belleau, E., Gauthier, D., Champion, J. L., . . . Dubois, E. (2015). Pestiviruses infections at the wild and domestic ruminants interface in the French Southern Alps. *Vet Microbiol*, 175(2-4), 341-348. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.025

Martin, C., Letellier, C., Caij, B., Gauthier, D., Jean, N., Shaffii, A., & Saegerman, C. (2011). Epidemiology of Pestivirus infection in wild ungulates of the French South Alps. *Veterinary microbiology*, 147(3), 320-328.

Martin, C., Letellier, C., Caij, B., Gauthier, D., Jean, N., Shaffii, A., & Saegerman, C. (2011). Epidemiology of Pestivirus infection in wild ungulates of the French South Alps. *Vet Microbiol*, 147(3-4), 320-328. doi:S0378-1135(10)00345-7 [pii] 10.1016/j.vetmic.2010.07.010

Maya, L., Puentes, R., Reolón, E., Acuña, P., Riet, F., Rivero, R., . . . Colina, R. (2016). Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Archives of Virology*, 161(3), 529-535. doi:10.1007/s00705-015-2688-4

McFadden, A., Tisdall, D., Hill, F., Otterson, P., Pulford, D., Peake, J., . . . Weir, A. (2012). The first case of a bull persistently infected with Border disease virus in New Zealand. *New Zealand veterinary journal*, 60(5), 290-296.

Meyers, G., & Thiel, H. J. (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res*, 47, 53-118.

Mishra, N., Rajukumar, K., Vilcek, S., Kalaiyarasu, S., Behera, S. P., Dubey, P., . . . Kulkarni, D. (2016a). Identification and molecular characterization of border disease virus (BDV) from sheep in India. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 44, 1-7.

Mishra, N., Rajukumar, K., Vilcek, S., Kalaiyarasu, S., Behera, S. P., Dubey, P., . . . Kulkarni, D. D. (2016b). Identification and molecular characterization of border

disease virus (BDV) from sheep in India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 44, 1-7.

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2015.11.001>

Neill, J. D., Ridpath, J. F., Fischer, N., Grundhoff, A., Postel, A., & Becher, P. (2014). Complete genome sequence of pronghorn virus, a pestivirus. *Genome Announc*, 2(3). doi:2/3/e00575-14 [pii] 10.1128/genomeA.00575-14

Nelson, D. D., Duprau, J. L., Wolff, P. L., & Evermann, J. F. (2016). Persistent Bovine Viral Diarrhea Virus Infection in Domestic and Wild Small Ruminants and Camelids Including the Mountain Goat (*Oreamnos americanus*). (1664-302X (Linking)). doi:D - NLM: PMC4703785 OTO - NOTNLM

Newcomer, B. W., Marley, M. S., Galik, P. K., Zhang, Y., Riddell, K. P., Boykin, D. W., . . . Givens, M. D. (2013). Effect of treatment with a cationic antiviral compound on acute infection with bovine viral diarrhea virus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 77(3), 170-176.

Niskanen, R., & Lindberg, A. (2003). Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *Vet J*, 165(2), 125-130.

Oguzoglu, T., Tan, M., Toplu, N., Demir, A., Bilge-Dagalp, S., Karaoglu, T., . . . Haas, L. (2009). Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup? *Veterinary microbiology*, 135(3), 374-379.

OIE, W. O. f. A. H. (2012). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2014* (S. Stewart Ed. Séptima edición ed.

Vol. Uno). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2014: World Organisation for Animal Health (OIE).

O'Sullivan, T., Friendship, R., Carman, S., Pearl, D. L., McEwen, B., & Dewey, C. (2011). Seroprevalence of bovine viral diarrhea virus neutralizing antibodies in finisher hogs in Ontario swine herds and targeted diagnostic testing of 2 suspect herds. *The Canadian Veterinary Journal*, *52*(12), 1342-1344.

Paniagua, J., García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Berriatua, E., Espunyes, J., Carbonero, A., . . . Cabezón, O. (2016). Absence of circulation of Pestivirus between wild and domestic ruminants in southern Spain. *The Veterinary record*, *178*(9), 215.

Passler, T., Riddell, K. P., Edmondson, M. A., Chamorro, M. F., Neill, J. D., Brodersen, B. W., . . . Walz, P. H. (2014). Experimental infection of pregnant goats with bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1 or 2. *Veterinary Research*, *45*(1), 38-38. doi:10.1186/1297-9716-45-38

Passler, T., & Walz, P. H. (2010). Bovine viral diarrhea virus infections in heterologous species. *Anim Health Res Rev*, *11*(2), 191-205. doi:10.1017/s1466252309990065

Paton, D. J. (1995). Pestivirus diversity. *J Comp Pathol*, *112*(3), 215-236.

Peterhans, E., Bachofen, C., Stalder, H., & Schweizer, M. (2010). Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary Research*, *41*(6), 44. doi:10.1051/vetres/2010016

Postel, A., Schmeiser, S., Oguzoglu, T. C., Indenbirken, D., Alawi, M., Fischer, N., . . . Becher, P. (2015). Close relationship of ruminant pestiviruses and classical Swine Fever virus. *Emerg Infect Dis*, 21(4), 668-672. doi:10.3201/eid2104.141441

Rajput, M. K. S., Darweesh, M. F., Park, K., Braun, L. J., Mwangi, W., Young, A. J., & Chase, C. C. L. (2014). The effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains on bovine monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC) phenotype and capacity to produce BVDV. *Virology Journal*, 11, 44-44. doi:10.1186/1743-422X-11-44

Ramírez Romero, R., Chavarría Martínez, B., López Mayagoitia, A., Rodríguez Tovar, L. E., & Nevárez Garza, A. M. (2012). Presencia del virus de la diarrea viral bovina y su asociación con otros cuadros patológicos en ganado en corral de engorda. *Veterinaria México*, 43, 225-234.

Riedel, C., Lamp, B., Heimann, M., König, M., Blome, S., Moennig, V., . . . Rümenapf, T. (2012). The Core Protein of Classical Swine Fever Virus Is Dispensable for Virus Propagation In Vitro. *PLoS Pathog*, 8(3), e1002598. doi:10.1371/journal.ppat.1002598

Risager, P. C., Fahnøe, U., Gullberg, M., Rasmussen, T. B., & Belsham, G. J. (2013). Analysis of classical swine fever virus RNA replication determinants using replicons. *Journal of General Virology*, 94(Pt 8), 1739-1748. doi:10.1099/vir.0.052688-0

Rümenapf, T., & Thiel, H.-J. (2008). Molecular Biology of Pestiviruses. In T. Mettenleiter & F. Sobrino (Eds.), *ANIMAL VIRUSES: Molecular Biology* (pp. 39-100): Caister Academic Press.

Saa, L. R., Perea, A., García-Bocanegra, I., Arenas, A. J., Jara, D. V., Ramos, R., & Carbonero, A. (2012). Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Tropical Animal Health and Production*, *44*(3), 645-649. doi:10.1007/s11250-011-9948-4

SAGARPA. (2014). *PRODUCCIÓN, PRECIO, VALOR Y PESO DE GANADO EN PIE Y CARNE EN CANAL*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA, MÉXICO Retrieved from <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-municipal-pecuario/> Retrieved from <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-municipal-pecuario/>.

Schleiner, A., Krametter-Frobscher, R., Schiefer, P., Loitsch, A., Golja, F., Mostl, K., & Baumgartner, W. (2006). [Seroepidemiological survey of sheep in Carinthia for the dissemination of ruminant pestiviruses]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, *119*(5-6), 203-208.

Schleiner, A., Krametter-Fröbtscher, R., Schiefer, P., Loitsch, A., Golja, F., Möstl, K., & Baumgartner, W. (2005). Seroepidemiological survey of sheep in Carinthia for the dissemination of ruminant pestiviruses. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, *119*(5-6), 203-208.

Schleiner, A., Metter-Frotscher, R. K., Schiefer, P., Loitsch, A., Golja, F., Mostl, K., & Baumgartner, W. (2006). Seroepidemiological survey of the dissemination of ruminant pestiviruses in sheep in Carinthia. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 119(5-6), 203-208.

Schmeiser, S., Mast, J., Thiel, H.-J., & König, M. (2014). Morphogenesis of Pestiviruses: New Insights from Ultrastructural Studies of Strain Giraffe-1. *Journal of Virology*, 88(5), 2717-2724. doi:10.1128/jvi.03237-13

Schweizer, M., & Peterhans, E. (2014). Pestiviruses. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 2(1), 141-163.

Schweizer, M., & Peterhans, E. (2014). Pestiviruses. *Annu Rev Anim Biosci*, 2, 141-163. doi:10.1146/annurev-animal-022513-114209

Segura-Correa, J. C., Domínguez-Díaz, D., Avalos-Ramírez, R., & Araez-Sosa, J. (2010). Intraherd correlation coefficients and design efectos for bovine viral diarrhoea, infectious bovine rhinotracheitis, leptospirosis and neosporosis in cow-calf system herds in North-eastern Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 96, 272-275.

Sheng, C., Kou, S., Jiang, Q., Zhou, C., Xiao, J., Li, J., . . . Xiao, M. (2014). Characterization of the C-terminal sequence of NS5A necessary for the assembly and production of classical swine fever virus infectious particles. *Research in veterinary science*, 97(2), 449-454.

Shi, H., Kan, Y., Yao, L., Leng, C., Tang, Q., Ji, J., & Sun, S. (2016). Identification of Natural Infections in Sheep/Goats with HoBi-like Pestiviruses in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, *63*(5), 480-484. doi:10.1111/tbed.12551

Smith, R. L., Sanderson, M. W., Walz, P. H., & Givens, M. D. (2008). Sensitivity of polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled serum samples and use of pooled polymerase chain reaction to determine prevalence of bovine viral diarrhea virus in auction market cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *20*(1), 75-78.

Snodgrass, D. R., Herring, J. A., Reid, H. W., Scott, F. M., & Gray, E. W. (1980). Virus infections in cattle and sheep in Scotland 1975-1978. *Vet Rec*, *106*(9), 193-194.

Solis-Calderon, J. J., Segura-Correa, V. M., & Segura-Correa, J. C. (2005). Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk factors. *Prev Vet Med*, *72*(3-4), 253-262. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.06.004

Stapleton, J. T., Fong, S., Muerhoff, A. S., Bukh, J., & Simmonds, P. (2011). The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, *92*(Pt 2), 233-246. doi:10.1099/vir.0.027490-0

Steffen, D. J., Topliff, C. L., Schmitz, J. A., Kammerman, J. R., Henningson, J. N., Eskridge, K. M., & Kelling, C. L. (2014). Distribution of lymphoid depletion and viral antigen in alpacas experimentally infected with Bovine viral diarrhea virus 1.

*Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(1), 35-41.  
doi:10.1177/1040638713509626

Stewart, S. (Ed.) (2012). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los animales Terrestres 2016* (Séptima ed.). OIE, Organización mundial de Sanidad Animal.

Strong, R., La Rocca, S. A., Paton, D., Bensaude, E., Sandvik, T., Davis, L., . . . Steinbach, F. (2015). Viral Dose and Immunosuppression Modulate the Progression of Acute BVDV-1 Infection in Calves: Evidence of Long Term Persistence after Intra-Nasal Infection. *PLoS ONE*, 10(5), e0124689.  
doi:10.1371/journal.pone.0124689

Susa, M., König, M., Saalmüller, A., Reddehase, M. J., & Thiel, H. J. (1992). Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J Virol*, 66(2), 1171-1175.

Sánchez-Castilleja, Y. M., Rodríguez Diego, J. G., Pedroso, M., & Cuello, S. (2012). Simultaneidad serológica de *Neospora caninum* con *Brucella abortus* y los virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en bovinos pertenecientes al Estado de Hidalgo, México. *Revista de Salud Animal*, 34, 95-100.

Tait, R. G., Downey, E. D., Mayes, M. S., Park, C. A., Ridpath, J. F., Garrick, D. J., & Reecy, J. M. (2013). Evaluation of response to bovine viral diarrhoea virus type 2 vaccination and timing of weaning on yearling ultrasound body

composition, performance, and carcass quality traits in Angus calves<sup>123</sup>. *J. Anim. Sci.*, 91(11), 5466-5476. doi:10.2527/jas.2012-5891

Talafha, A. Q., Hirche, S. M., Ababneh, M. M., & Al-Majali, A. M. (2009). Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. *Tropical Animal Health and Production*, 41(4), 499-506. doi:10.1007/s11250-008-9214-6

Tamura, T., Ruggli, N., Nagashima, N., Okamatsu, M., Igarashi, M., Mine, J., . . . Kida, H. (2015). Intracellular membrane association of the N-terminal domain of classical swine fever virus NS4B determines viral genome replication and virulence. *Journal of general virology*, 96(9), 2623-2635.

Tamura, T., Sakoda, Y., Yoshino, F., Nomura, T., Yamamoto, N., Sato, Y., . . . Kida, H. (2012). Selection of Classical Swine Fever Virus with Enhanced Pathogenicity Reveals Synergistic Virulence Determinants in E2 and NS4B. *Journal of Virology*, 86(16), 8602-8613. doi:10.1128/JVI.00551-12

Tao, J., Liao, J., Wang, Y., Zhang, X., Wang, J., & Zhu, G. (2013). Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in pigs. *Veterinary Microbiology*, 165(3-4), 185-189. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.010

Tinsley, M., Lewis, F. I., & Brülisauer, F. (2012). Network modeling of BVD transmission. *Veterinary Research*, 43(1), 11-11. doi:10.1186/1297-9716-43-11

Toplu, N., Oğuzoğlu, T. Ç., Epikmen, E. T., & Aydoğan, A. (2011). Neuropathologic Study of Border Disease Virus in Naturally Infected Fetal and

Neonatal Small Ruminants and Its Association With Apoptosis. *Veterinary Pathology Online*, 48(3), 576-583. doi:10.1177/0300985810371309

Tuncer-Goktuna, P., Alpay, G., Oner, E. B., & Yesilbag, K. (2016). The role of herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-4) and pestiviruses (BVDV and BDV) in ruminant abortion cases in western Turkey. *Trop Anim Health Prod*. doi:10.1007/s11250-016-1050-5

Valdazo-González, B., Alvarez-Martinez, M., & Greiser-Wilke, I. (2006). Genetic typing and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain. *Veterinary microbiology*, 117(2), 141-153.

Valle, P. S., Martin, S. W., Tremblay, R., & Bateman, K. (1999). Factors associated with being a bovine-virus diarrhoea (BVD) seropositive dairy herd in the More and Romsdal County of Norway. *Prev Vet Med*, 40(3-4), 165-177.

VanderLey, B., Ridpath, J., & Sweiger, S. (2011). Comparison of Detection of Bovine Virus Diarrhea Virus Antigen in Various Types of Tissue and Fluid Samples Collected from Persistently Infected Cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(1), 84-86. doi:10.1177/104063871102300112

Vega, S., Rosell, R., Paton, D., & Orden, J. (2000). Antigenic characterization of bovine viral diarrhoea virus isolates from Spain with a panel of monoclonal antibodies. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 47(9), 701-706.

Vickers, M., & Wright, N. (2007). Economic Impact of Health and Welfare Issues in Beef Cattle and Sheep in England.

Vilcek, S., Bjorklund, H. V., Horner, G. W., Meers, J., & Belak, S. (1998). Genetic typing of pestiviruses from New Zealand. *N Z Vet J*, *46*(1), 35-37.

Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., & Paton, D. J. (2005). Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev Vet Med*, *72*(1-2), 31-35.

Xue, W., Mattick, D., Smith, L., & Maxwell, J. (2009). Fetal protection against bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 after the use of a modified-live virus vaccine. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *73*(4), 292-297.

Yazici, Z., Serdar, M. S., Gumusova, S. O., & Albayrak, H. (2012). Molecular diagnosis and seroepidemiology of pestiviruses in sheep. *Veterinarski Arhiv*, *82*(1), 35-45.

Yesilbag, K., Forster, C., Ozyigit, M. O., Alpay, G., Tuncer, P., Thiel, H. J., & Konig, M. (2014). Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Vet Microbiol*, *169*(1-2), 42-49. doi:10.1016/j.vetmic.2013.12.005

Zürcher, C., Sauter, K.-S., Mathys, V., Wyss, F., & Schweizer, M. (2014). Prolonged Activity of the Pestiviral RNase Erns as an Interferon Antagonist after Uptake by Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology*, *88*(13), 7235-7243. doi:10.1128/jvi.00672-14

Ávalos Ramírez, R. (2007). Actividades y estrategias de Investigación para la detección y epidemiología de agentes infecciosos selectos de Bovinos en el

Noreste de México. In (pp. 21). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Ávalos Ramírez, R., Cedillo Rosales, S., Salinas, Meléndez, J. A., Morales Loredo, A., Cervantes Vega, R., . . . CAPRINO, C. D. G. (2010). Parasitosis y enfermedades comunes de caprinos en majadas de Nuevo León: Prevalencia y descripción. Consorcio Técnico del Noreste de México, A.C. Nuevo León, México.

SISTEMA INTEGRAL DE INFORMACIÓN Y DIFUSIÓN.



**10. Cantidad de abortos en el rancho:** Este año: \_\_\_\_ Año pasado: \_\_\_\_ No lo sabe: \_\_\_\_

**11. Los abortos en sus animales, ¿en qué periodo de la gestación ocurren?** a) (0-1mes) b) (2-3 meses) c) (4-5 meses) d) No sabe

**12. ¿Cuáles son los animales que más abortan?**  
 Hembras de primera monta      Hembras >1 un parto      No sabe

**13. ¿Cuándo hay abortos que destino les da a la placenta y feto abortados?**  
 a) Los quema o entierra      b) NO se recogen      d) otro: \_\_\_\_\_

**14. De los corderos / cabritos recién nacidos ¿cuántos mueren?**  
 a) Menos de 10%      b) Entre 10 y 20%      c) Más del 20%

**15. ¿Cuál es la causa más común de muerte de corderos en su rancho?**

**16. En sus animales ¿Qué edad presenta más enfermedades?**  
 a) Menores de 1 año      b) 1-2 años      c) Más de 2 años

	<b>De las siguientes prácticas sanitarias y de manejo ¿Cuáles realiza en su rancho?</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>A veces</b>	<b>Nunca</b>
<b>17</b>	Utiliza una 1 aguja por animal				
<b>18</b>	Aísla animales enfermos				
<b>19</b>	Restringe la entrada de visitantes a su rancho				
<b>20</b>	Separa a las hembras que van a parir antes de la fecha de parto.				
<b>21</b>	Envía al laboratorio muestras de animales que abortan o mueren para saber la causa de aborto o muerte.				
<b>22</b>	¿Ha observado y/o registrado bajos pesos al nacimiento de sus corderos?				
<b>23</b>	¿Ha observado retraso en el desarrollo de algunos o varios corderos destetados?				
<b>24</b>	Ha observado malformaciones (anormalidades) de los recién nacidos				
<b>25</b>	Separa usted los animales destetados de acuerdo a la edad				
<b>26</b>	¿Lava y desinfecta los instrumentos antes de usarlos?				
<b>27</b>	¿Ha introducido nuevos machos o hembras a su rancho?				
<b>28</b>	¿Cuarentena y realiza pruebas de laboratorio a nuevos animales que ingresan para detectar enfermedades?				
<b>29</b>	Tiene un Médico Veterinario exclusivo en su rancho.				

**Comentarios y/o Sugerencias  
 MUCHAS GRACIAS POR SU COOPERACIÓN**