



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR TIEMPO REAL PARA LA IDENTIFICACIÓN
Y CUANTIFICACIÓN DE LOS VIRUS BOVINOS DVB, HVB-1, PIB-3, RSB Y
LVB”.

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

MARIO PALMA ZEPEDA

TUTOR PRINCIPAL

ROSA ELENA SARMIENTO SILVA -FMVZ-UNAM,

COMITÉ TUTORAL:

ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES-FMVZ-UNAM

SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA-FESC-UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I. DEDICATORIAS

- A mi familia. Mi padres Ramón (Monchis)[†] , donde quiera que estés sabes que éste logro es gracias a ti y para ti; Gloria por tu incondicional apoyo y transmitirme esa admirable valentía y fortaleza de seguir adelante sin importar las circunstancias, Gerardo y Luis Alberto, por las palabras alentadoras y Eduardo que sin duda alguna compartió entre tantas cosas compartidas, éstos desvelos maratónicos al inicio y durante el desarrollo de éste proyecto pieza fundamental para llegar a tiempo a clases. Mis sobrinos fuente de inspiración y motivación. Jimena, Renata, Camila, Rodrigo y Farid. Los quiero Mucho.
- A la persona que me brindo la confianza sin conocerme, que me ha enseñado que la perseverancia es lo único que te lleva a lograr tus metas. Que no importa donde te encuentres siempre puedes y debes dar lo mejor de ti en cada una de las actividades que desempeñas además de compartir el conocimiento adquirido. La honestidad, la verdad, el entender que las alas no necesariamente están presentes en los aviones, en las aves o cualquier ente biológico que las posea, sino que tu imaginación es basta para que emprendas el vuelo hacia la dirección que tu deseas siempre y cuando sea en beneficio propio y en consecuencia de las personas que te rodean. Mil gracias por todo Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva.

II. AGRADECIMIENTOS

- Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Laboratorio de Virología 3309, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM. Rosa Elena Sarmiento, Teresa López, Barushz Mata, Nallely Vázquez, Liliana Vázquez, Marina Orozco, Juan Carlos Martínez, Armando Cruz, Mario Cruz, Elvia Lazo, Alejandra Hernández[†].
- Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Estadística de la FMVZ-UNAM. Rogelio Alonso, Amanda Gayosso, Pablo Pintor, Rodrigo Téllez, Vianey Andoney, Luz González, Eduardo Aguilar.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

ÍNDICE

I. DEDICATORIAS	2
II. AGRADECIMIENTOS.....	3
III. ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
IV. ÍNDICE DE CUADROS	9
V. RESUMEN.....	10
VI. ABSTRACT.....	11
VII. LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
1.1.1. PCR TIEMPO REAL.....	15
1.1.1.2. Sistemas de detección por fluorescencia en PCR tiempo real ..	17
1.1.1.3. Estrategias para cuantificación en PCR tiempo real.....	19
1.1.1.4. Validación de los ensayos de PCR tiempo real	19
1.1.1.5. PCR y RT- PCR tiempo real para el Diagnóstico Veterinario.....	20
1.1.2. <i>Inventario de ganado bovino en México</i>	21
1.1.3. <i>Agentes virales de interés en la producción ganadera bovina mexicana</i>	22
1.1.3.1. Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB).....	24
1.1.3.1.1. <i>Organización del genoma</i>	24
1.1.3.1.2. <i>Proteínas virales</i>	25
1.1.3.1.3. <i>Replicación viral</i>	27
1.1.3.1.4. <i>Epidemiología</i>	29
1.1.3.1.5. <i>Patogenia</i>	29
1.1.3.2. Virus de parainfluenza bovina tipo 3 (VPIB-3)	30
1.1.3.2.1. <i>Organización del genoma</i>	31
1.1.3.2.2. <i>Proteínas virales</i>	31
1.1.3.2.3. <i>Replicación viral</i>	33
1.1.3.2.4. <i>Epidemiología</i>	33
1.1.3.2.5. <i>Patogenia</i>	34
1.1.3.3. Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB).....	35
1.1.3.3.1. <i>Organización del genoma</i>	35
1.1.3.3.3. <i>Biotipos</i>	38
1.1.3.3.4. <i>Genotipos</i>	39
1.1.3.3.5. <i>Replicación viral</i>	40
1.1.3.3.6. <i>Epidemiología</i>	42
1.1.3.3.7. <i>Patogenia</i>	42
1.1.3.4. VIRUS HERPES BOVINO TIPO 1	44
1.1.3.4.1. <i>Organización del genoma</i>	45
1.1.3.4.2. <i>Proteínas virales</i>	45
1.1.3.4.3. <i>Replicación viral</i>	46
1.1.3.4.4. <i>Patogenia</i>	48
1.1.3.4.5. <i>Latencia</i>	49
1.1.3.5. Virus de la Leucosis Viral Bovina (VLVB)	50

1.1.3.5.1. Estructura del genoma.....	50
1.1.3.5.2. Replicación viral.....	50
1.1.4. Diagnóstico de los virus bovinos RSV, PIB-3, DVB, HVB-1 y LVB .	51
2. JUSTIFICACIÓN.....	52
3. OBJETIVOS	53
3.1. OBJETIVO GENERAL	53
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4. MATERIAL Y MÉTODO	54
4.1. LÍNEAS CELULARES.....	54
4.2. VIRUS	54
4.2.1. Propagación.....	54
4.2.2. Titulación de los virus por TCID _{50%} /ml	55
4.3. PCR Y RT-PCR PUNTO FINAL	55
4.3.1. Expresión de los genes N del VRSB, N del VPIB-3, 5'UTR del VDVB, gB del HVB-1 y pol del VLVB.....	55
4.3.1.1. Extracción de ácidos nucleicos.	55
4.3.1.1.1. Extracción de RNA por Fenol-Ácido.....	55
4.3.1.1.2. Extracción de DNA con la técnica de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico.....	56
4.3.1.2. RT-PCR para la amplificación del gen N del VRSB a partir de virus de referencia ATCC cepa Iowa.	56
4.3.1.3. RT-PCR para la amplificación del gen N del VPIB-3 a partir de virus de referencia ATCC 375.....	57
4.3.1.4. RT-PCR para la amplificación de la región 5'UTR del VDVB genotipos I a partir de virus de referencia ATCC cepa NADL citopática y genotipo II a partir de vacuna comercial.	57
4.3.1.5. PCR para la amplificación del gen de la glicoproteína B (gB) del HVB-1 a partir de cepa de referencia ATCC Oregon.....	58
4.3.1.6. PCR para la amplificación del gen pol del VLVB a partir de línea celular persistentemente infectada L 3.1	59
4.4. GENERACIÓN DE CONTROLES ESTÁNDARES DE CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA PARA RT-PCR Y PCR TIEMPO REAL A PARTIR DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES (RECDNA)	60
4.4.1. Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa con NaI y perlas de sílice.	60
4.4.2. Clonación de productos de PCR purificados.....	61
4.4.3. Ligación de productos de PCR en el vector plasmídico pTZ57R/T.	61
4.4.4. Transformación de bacterias competentes <i>Escherichia coli</i> DH5α y confirmación de clones recombinantes	61
4.4.5. Confirmación de clones recombinantes por secuenciación	62
4.4.6. Conservación de clones recombinantes.....	63
4.4.7. Obtención de recDNA a gran escala (Maxiprep).....	64
4.5. ESTANDARIZACIÓN DE PCR Y RT-PCR TIEMPO REAL.....	65
4.5.1. Especificidad de la PCR y RT-PCR tiempo real.....	67
4.5.2. Sensibilidad de la PCR y RT-PCR tiempo real.....	68
4.5.3. Repetibilidad de la PCR y RT-PCR tiempo real	68

5. RESULTADOS.....	69
5.1. PROPAGACIÓN DE LOS VIRUS.....	69
5.2. PCR Y RT-PCR PUNTO FINAL.....	70
5.2.1. Expresión de los genes N del VRSB, N del VPIB-3, región 5'UTR del VDVB I y II, gB del VHB-1, pol del VLVB.....	70
5.3. GENERACIÓN DE CONTROLES ESTÁNDARES DE CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA PARA PCR Y RT-PCR TIEMPO REAL A PARTIR DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES (RECDNA).....	74
5.4. PCR Y RT-PCR TIEMPO REAL.....	78
5.4.1. Especificidad.....	78
5.4.2. Sensibilidad.....	78
5.4.3. Repetibilidad.....	82
5.4.4. Comparación del número de copias y el título viral.....	88
6. DISCUSIÓN.....	89
7. CONCLUSIONES.....	94
8. LITERATURA CITADA.....	95

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Monoestrato de células VERO infectadas con VRSB cepa Iowa.....	69
Figura 2.	Monoestrato de células VERO infectadas con VPIB-3 cepa 375.....	69
Figura 3.	Monoestrato de células VERO infectadas con HVB-1 cepa Oregon.....	70
Figura 4.	Monoestrato de células VERO sin infectar.....	70
Figura 5.	Gel de agarosa al 3% para muestras de PCR de la región UTR 5' del VDVBI.....	71
Figura 6.	Gel de agarosa al 3% para muestras de PCR del gen de la nucleoproteína del VRSB.....	71
Figura 7.	Gel de agarosa al 3% para muestras de PCR del gen de la nucleoproteína del VPIB-3.....	72
Figura 8.	.Gel de agarosa al 3% para muestras de PCR del gen de la glicoproteína B (gB) del HVB-1.....	72
Figura 9.	Gel de agarosa al 3% para muestras de PCR del gen <i>pol</i> del VLVB.....	73
Figura 10.	Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio para visualizar productos de PCR. Productos de amplificación de los iniciadores dirigidos hacia el sitio múltiple de clonación del vector T con el inserto de VDVB I; de VRSB; de LVB y con el inserto de HVB1.....	75
Figura 11.	Alineamiento de la construcción pDVBI9 con secuencias reportadas en GenBank del VDVB genotipo I.....	76
Figura 12.	Alineamiento de la construcción pDVBI19 con secuencias reportadas en GenBank del VDVB genotipo II.....	76
Figura 13.	Alineamiento de la construcción pVRSB7 con secuencias reportadas en GenBank del VRSB.....	77
Figura 14.	Alineamiento de la construcción pHVB1-17 con secuencias	

	reportadas en GenBank del VHB-1.....	77
Figura 15.	Alineamiento de la construcción pLVB9 con secuencias reportadas en GenBank del VLVB.....	77
Figura 16.	Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pDVBI.9.....	79
Figura 17.	Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pDVBI.19	80
Figura 18.	Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pRSV7.....	80
Figura 19.	Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pLVB9.....	80
Figura 20.	Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pHVB-1.17.....	81
Figura 21.	Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pPIB3.10.....	81
Figura 22.	Ensayo de repetibilidad para el pDVBI.9.....	82
Figura 23.	Ensayo de repetibilidad para el pDVBI.19.....	83
Figura 24.	Ensayo de repetibilidad para el pRSV7.....	83
Figura 25.	Ensayo de repetibilidad para el pLVB9.....	84
Figura 26.	Ensayo de repetibilidad para el pHVB-1.17.....	84

IV. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Iniciadores y sondas empleados para PCR y RT-PCR tiempo real.....	65
Cuadro 2.	Controles de cuantificación estándar contruidos mediante clonación a partir de los virus de referencia en estudio.....	73
Cuadro 3.	Variación intra ensayo para el pDVBI.9.....	84
Cuadro 4.	Variación intra ensayo para el pDVBI.19.....	84
Cuadro 5.	Variación intra ensayo para el pRSV7.....	85
Cuadro 6.	Variación intra ensayo para el pLVB9.....	85
Cuadro 7.	Variación intra ensayo para el pHVB-1.17.....	86
Cuadro 8.	Variación intra ensayo para el pVPIB-3.10.....	86
Cuadro 9.	Comparación del número de copias y el título viral	86

V. RESUMEN

Los virus de la diarrea viral bovina (VDVB), respiratorio sincitial bovino (VRSB), parainfluenza bovina tipo 3 (VPIB-3), y herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1), son los principales agentes virales implicados en el CRB, provocando inmunosupresión y daño a nivel del epitelio pulmonar, predisponiendo a infecciones bacterianas oportunistas en lotes de ganado de engorda bovina. Por otra parte el virus de la leucocis viral bovina (VLVB) causa daños principalmente en sistemas de producción lechera, cada uno de éstos virus con sus propias consecuencias sobre el hospedero, el desarrollo de signos clínicos e implicaciones económicas. El uso de la PCR tiempo real en el diagnóstico de las enfermedades virales tiene la ventaja de ser cuantificable, determinar cargas virales en las muestras sometidas a diagnóstico y disminuir el riesgo de contaminación durante el procesamiento de la misma. El objetivo de este trabajo fue la estandarización del método diagnóstico de PCR tiempo real de los virus VDVB, HVB-1, VRSB, VPIB-3, y VLVB. Se desarrollaron controles estándar de cuantificación a partir de virus de referencia. La sensibilidad de los ensayos fueron determinados mediante curvas de cuantificación absoluta realizando diluciones logarítmicas seriadas de los controles DNA estándar de cuantificación, así como de los virus titulados. El nivel de detección fue de 306 copias de genoma viral para el HVB-1, 3040 para VLVB, 2990 para VDVB1, 299 para VDVB2 y 316 para VRSB. Además el ensayo de PCR tiempo real para el VDVB tuvo la capacidad para determinar los genotipos I y II, mediante un ensayo de discriminación alélica.

Palabras clave: CRB, BVDV, BRSV, BPIV-3, BHV1, BLV, PCR tiempo real, estandarización y diagnóstico.

VI. ABSTRACT

The virus of bovine viral diarrhea (BVDV), bovine respiratory syncytial (BRSV), bovine parainfluenza type 3 (BPIV-3) and bovine herpesvirus type 1 (BHV1) are the major viral agents implicated in the BRDC, causing immunosuppression and damage to pulmonary epithelium, predisposing to opportunistic bacterial infections in feed lots, and bovine viral leukosis (BLV) in dairy systems each with its own consequences of host, clinical signs and economic implications. The use of real-time PCR, has the characteristic of being quantifiable allowing to determine the viral load present in the samples subjected to diagnostic as well as being faster processing and reduce the risk of contamination during processing of the sample. The aim of this work was the standardization of a real time RT-PCR method for the diagnosis of the BVDV, BHV1, BRSV, BPIV-3 and BLV. We developed DNA quantification standard controls from reference virus. The sensitivity of the test was determined by absolute quantification by serial log dilutions of DNA quantification standard controls as well by dilutions of titrated virus. The sensitivity level detection were of 306 copies of viral genome for BHV1, 3040 for BLV, 2990 for BVDVI, 299 for BVDVII, and 316 for BRSV. Furthermore the real time PCR assay for bovine viral diarrhea virus has the ability to determine the genotypes I and II, by allelic discrimination assay

Keywords: BRCD, BVDV, BRSV, BPIV-3, BHV1, BLV, real time PCR, standardization and diagnosis.

VII. LISTA DE ABREVIATURAS

- **AA:** aminoácidos
- **ATCC:** American Type Culture Collection
- **ATPasa:** enzima que produce la hidrólisis del adenosin trifosfato
- **BDV:** virus de la enfermedad de las fronteras
- **BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool
- **cbp:** cuanto baste para
- **CD46 bovino:** ligando perteneciente a la familia de los reguladores de la activación del complemento
- **cDNA:** ácido desoxiribonucleico de cadena complementaria
- **cp:** citopático
- **CRB:** Complejo Respiratorio Bovino
- **CSFV:** virus de la fiebre porcina clásica
- **Ct:** ciclo umbral
- **CV:** Coeficiente de Variación
- **DEPC:** dietil pirocarbonato
- **DMEM:** Medio Mínimo Esencial de Dulbeco Modificado
- **DNA:** ácido desoxiribonucleíco
- **dNTPs:** dioxinucleótidos trifosfatados
- **dsDNA:** ácido desoxiribonucleico de doble cadena
- **ECP:** efecto citopático
- **ELISA:** ensayo inmunoenzimático
- **FRET:** Transferencia de Energía mediante Resonancia
- **GAGs:** glicosaminoglicanos de la superficie celular
- **gr:** gramo
- **HVB-1:** virus herpes bovino tipo 1
- **INF α :** Interferón alfa
- **INF β :** Interferón beta
- **INF:** interferon tipo 1

- **IPTG:** Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, análogo no hidrolizable de la alolactosa para inducir la expresión de genes *in vitro*.
- **IRES:** sitio interno de entrada al ribosomal
- **kb:** kilobases
- **kDa:** kiloDalton
- **LAT:** transcrito asociado a la latencia del HVB-1
- **LB:** medio de cultivo bacteriano Luria-Bertani
- **MDBK:** Madin Dardy Bovine Kidney
- **ml:** mililitro
- **mM:** milimolar
- **mRNA:** ácido ribonucleico mensajero
- **Nal:** Ioduro de Sodio
- **ncp:** no citopático
- **ng:** nanogramo
- **ORF:** marco abierto de lectura (open reading frame)
- **pb:** pares de bases
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **pH:** potencial de Hidrógeno
- **PI:** ternero persistentemente infectado
- **PR:** proteasa del VLVB
- **R²:** Análisis estadístico de regresión lineal
- **recDNA:** ácido desoxiribonucleico recombinante
- **RNA:** ácido ribonucleico
- **RNAsas:** enzimas que degradan al ácido ribonucleico
- **RNP:** ribonucleoproteína
- **rpm:** revoluciones por minuto
- **RT-PCR:** Retrotranscripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **SAGARPA:** Secretaría de Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
- **SD:** desviación estándar
- **SFB:** Suero Fetal Bovino
- **SIAP:** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

- **TAE:** disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA, de uso frecuente en electroforesis.
- **TCID_{50%}:** Dosis Infecciosa en Cultivo Celular al 50%
- **TG:** tejido ganglionar
- **TR:** transcriptasa reversa del VLVB
- **UI:** Unidades Internacionales
- **UTR 5':** región no traducible 5'
- **VDVB:** virus de la diarrea viral bovina
- **VLVB:** virus de la leucosis viral bovina
- **VPIB-3:** virus de la parainfluenza bovina tipo 3
- **VPIH-3:** virus de la parainfluenza humana tipo 3
- **VRSB:** Virus Respiratorio Sincitial Bovino
- **X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido, compuesto orgánico empleado en clonación molecular como indicador de aquellas células que expresan la enzima β -galactosidasa, codificada en el gen *lacZ* del operón lac.
- **α -TIF:** factor de transducción de genes alfa del HVB-1
- **μ l:** microlitro
- **μ M:** micromolar

1. INTRODUCCIÓN

1.1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1.1. PCR TIEMPO REAL

El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el diagnóstico molecular ha incrementado hasta el punto en que es aceptada ahora como la prueba estándar de oro, para la detección de ácidos nucleicos a partir de diferentes orígenes y está siendo una prueba o plataforma esencial en la investigación en los laboratorios.

Este método utiliza un par de oligonucleótidos sintéticos o primers (iniciadores) cada uno hibridando con una cadena de una doble cadena de DNA (dsDNA) templado. El primer hibridado actúa como un sustrato para la DNA polimerasa la cual crea una cadena complementaria a través de una vía secuencial adicionando deoxinucleótidos. El proceso se puede resumir en tres pasos: (i) separación o desnaturalización de dsDNA a temperaturas mayores a 90°C, (ii) alineación de los iniciadores a rangos de temperatura 50-75°C, (iii) extensión óptima de 72-78°C. Tanto el número de ciclos empleados como los cambios de temperatura son controlados por un equipo llamado termociclador.

La PCR se ha aplicado principalmente como un método cualitativo, ya que para llevar a cabo la cuantificación en los productos de estas reacciones se necesita mucho tiempo y los métodos para realizarla son relativamente difíciles de implementar. Además, debe tenerse en cuenta que en los últimos ciclos de la reacción de la PCR, la cantidad de producto no guarda relación con la cantidad inicial de DNA o cDNA en las muestras a analizarse (Valasek y Repa, 2005).

El monitoreo de la acumulación del amplicón en tiempo real es posible mediante el marcado de iniciadores, sondas o del amplicón con moléculas

fluorescentes. La PCR en tiempo real puede generar amplicones muy pequeños (desde 60 pb) lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas o experimentales, así como para la cuantificación de niveles de mRNA en muestras de tejidos con RNA parcialmente degradado (Bustin, 2005). En esta prueba el producto de la PCR se mide al final de cada ciclo. Los datos pueden ser analizados mediante un software informático y el número de copias de mRNA o la expresión génica relativa entre varias muestras puede calcularse (Heid *et al.*, 1996).

Mediante el análisis de cinética de la reacción de PCR, se puede dividir el proceso de amplificación en tres fases: geométrica, lineal y estacionaria. Durante la fase geométrica los reactivos de la reacción se encuentran en abundancia; en esta etapa la eficiencia de la amplificación bajo las condiciones experimentales es muy cercana al 100%, en la fase de la cinética de amplificación tiene un comportamiento 2^n en donde a partir de una molécula de DNA se generan 2 moléculas de DNA. En la fase lineal, los iniciadores, dNTPs y/o la enzima comienzan a ser factores limitantes además de la generación de pirofosfato y decaimiento de la actividad enzimática que afectan la eficiencia de amplificación de manera constante, por lo que no es posible llevar a cabo un ensayo cuantitativo en esta parte. Y por último la fase estacionaria de la reacción de PCR, en este punto se detiene la amplificación, la cantidad de producto obtenida es constante sin importar cuantos ciclos más se prolongue la reacción dados los factores mencionados previamente.

Una limitación de la PCR en tiempo real es que se debe utilizar DNA como secuencia diana, ya que las DNA polimerasas no pueden amplificar RNA de una manera similar. Este problema se puede superar mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa para generar cDNA a partir de una plantilla de RNA (Valasek y Repa, 2005).

1.1.1.2. Sistemas de detección por fluorescencia en PCR tiempo real

Los sistemas de detección por fluorescencia empleadas en PCR tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes (marcadores fluorescentes genéricos) y sondas específicas marcadas con fluorocromos que se unen a amplicones específicos (producto de PCR).

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble cadena. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green I. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de iniciadores, muy frecuentes en la PCR. (Ririe *et al.*, 1997).

Las sondas de hibridación específica, son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas molecular beacons y las sondas FRET. Las sondas de hidrólisis. Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera ha de solaparse con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de la secuencia de DNA diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la DNA polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciendo la liberación del fluorocromo donador (Holland *et al.*, 1991).

Los equipos para PCR a tiempo real están compuestos por un termociclador y por un lector de fluorescencia y diseñados para poder efectuar la lectura de la fluorescencia emitida en cada uno de los viales usados y en cualquier momento de la reacción. Las diferencias más importantes entre éstos equipos hacen referencia a la rapidez y al número de muestras que se pueden procesar al mismo tiempo, el número de canales de lectura que presentan (esto permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez), de esta manera se puede usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar diferentes tipos de DNA diana en la misma reacción (PCR múltiple) o incorporar controles internos a la reacción.

Para obtener estos resultados, los valores umbral de ciclo (Ct por sus siglas en inglés) deben ser obtenidos. Los valores Ct son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (Bustin, 2005). Es importante considerar que un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos. En la actualidad hay software que puede determinar valores Ct mediante un análisis matemático de la curva de crecimiento pudiendo tener así una mejor reproducibilidad en las pruebas de PCR en tiempo real (Dorak, 2006).

Para obtener resultados confiables en las pruebas realizadas con la PCR en tiempo real es necesario optimizar la reacción en el laboratorio. La optimización consiste en hacer que las variaciones normales de la prueba no causen efectos importantes en los valores Ct y que tengan un impacto mínimo en la cantidad de fluorescencia observada. Los criterios más importantes para la optimización son especificidad, sensibilidad, eficiencia y repetibilidad de la PCR en tiempo real.

1.1.1.3. Estrategias para cuantificación en PCR tiempo real

Comúnmente se emplean dos estrategias para llevar a cabo la cuantificación de la expresión genética con PCR en tiempo real. Estas estrategias son: cuantificación absoluta y cuantificación relativa de la PCR en tiempo real.

El modelo de la cuantificación absoluta, permite determinar el número exacto de moléculas de DNA o RNA presentes en una muestra determinada, por lo cual es necesario utilizar una curva de calibración a partir de un stock de estándares de concentración conocida y determinada por otra técnica en la cual las unidades estén expresadas en número de copias, ng/μl, μmol/μl de la secuencia blanco en específico.

La curva estándar de cuantificación absoluta se construye a partir de los valores de Ct obtenidos para cada curva estándar y graficados contra el logaritmo de la concentración correspondiente. Los estándares para la construcción de la curva patrón para cuantificación absoluta deben de cumplir los siguientes requisitos: DNA o RNA puro, DNA plasmídico o RNA transcrito *in vitro*, específico de la secuencia blanco de concentración conocida; pipeteo exacto crucial para preparar estándares (10^{-1} a 10^{-12}), y mantener la estabilidad de los estándares diluidos.

1.1.1.4. Validación de los ensayos de PCR tiempo real

En todo ensayo de cuantificación, es necesario evaluar el rango dinámico en el cual se van a obtener los resultados para determinar la eficiencia de amplificación y sensibilidad de la técnica. Se utiliza una curva estándar, a partir de una muestra de DNA/RNA usando diluciones seriadas 1:10, la cual se amplifica y se determina por triplicado. A partir de los resultados de Ct, se construye una gráfica contra el logaritmo de la concentración, analizando en la gráfica los siguientes valores:

1.- La correlación lineal entre los puntos determina que la eficiencia de amplificación no se ve afectada por la cantidad de templado inicial y es la misma en el rango de detección probado.

2.- Finalmente la pendiente de la recta deberá ser cercana a -3.32 lo que corresponde a una eficiencia de amplificación igual al 100%, para llevar a cabo un ensayo de PCR cuantitativo en tiempo real un valor de hasta 92% de eficiencia es aceptable.

Por último las ventajas de la PCR a tiempo real es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Otra ventaja muy importante es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Los sistemas a tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en la muestra de manera más sencilla, precisa y en un rango mayor (5-6 log) que con los procedimientos convencionales (2-4 log).

1.1.1.5. PCR y RT- PCR tiempo real para el Diagnóstico Veterinario

La PCR y RT-PCR en tiempo real se ha convertido en una de las técnicas más importantes para la detección y el monitoreo de las infecciones virales. La vigilancia de la carga viral es un indicador muy importante para identificar un infección viral activa, la interacción virus-hospedero, así como las respuestas a terapias antivirales (Watzinger *et al.*, 2006). Ensayos diagnósticos comerciales están disponibles, pero solo para un reducido número de enfermedades virales; lo cual conlleva a que laboratorios enfocados al diagnóstico a desarrollar sus propia metodología diagnóstica y estrategias de cuantificación para diferentes agentes virales de interés clínico (Watzinger *et al.*, 2006).

Por ejemplo, actualmente la OIE recomienda el uso de la RT-PCR en tiempo para la vigilancia del virus de Influenza, porque es una prueba que aporta un diagnóstico rápido y sensible de los subtipos H5 y H7 de la influenza A, y permite un alto rendimiento.

1.1.2. Inventario de ganado bovino en México

En México en base a registros que tiene el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) hasta el año 2013 la población de bovinos para carne es de 29,992,172 y de bovinos para leche de 2,410,289 obteniendo un total de 32,402,461 animales a nivel nacional. Siendo esta especie la segunda más importante para el sector pecuario seguida de la especie avícola, teniendo una producción anual reportada hasta el 2013 de 3,405,841 toneladas de ganado en pie (peso promedio de 387 kilogramos) y 1,806,758 toneladas en canal (205 kilogramos por animal). El ganado bovino lechero reporta una producción anual de 10,965,632 toneladas.

Los estados que tienen un mayor porcentaje de participación en producción de carne de bovino en canal con respecto al total nacional para el año 2013 fueron: Veracruz (13.65%), Jalisco (11.43%), Chiapas (6.56%), Sinaloa (5.21%) y Michoacán (4.43%). En cuanto a la producción de leche de ganado bovino los estados fueron: Jalisco (18.95%), Coahuila (12.10%), Durango (9.27%), Chihuahua (8.94%) y Guanajuato (6.50%). (fuente: SIAP, SAGARPA, 2014).

Tomando en cuenta los datos anteriores destaca la importancia de este sector pecuario para el país y por lo tanto la producción en las unidades ganaderas debe mantener adecuadas medidas de medicina preventiva, nutricionales, bioseguridad y sanitarias de los bovinos todo esto enfocado a evitar o disminuir pérdidas económicas por presencia de enfermedad, aunado a un diagnóstico específico de las enfermedades con las que se encuentran en contacto los bovinos.

1.1.3. Agentes virales de interés en la producción ganadera bovina mexicana

De las enfermedades que más afectan los sistemas de producción bovinos a nivel mundial se encuentran el Complejo Respiratorio Bovino (CRB), el cual se ha estudiado desde los años 1800 y continúa siendo objeto de estudio principalmente en unidades de engorda. Por otra parte la leucosis enzoótica bovina es una de las enfermedades virales de las cuales se sabe que afecta gravemente las unidades de producción lechera a nivel mundial, pero en México no existen antecedentes que nos indiquen la prevalencia de ésta enfermedad, debido a que no se realiza el diagnóstico de ésta enfermedad o dadas las características de la misma los productores pueden pensar que su ganado se encuentra libre de ésta enfermedad.

Las causas predisponentes del CRB son sinérgicas incluyendo edad, estrés (competencia por espacio, peso, cambios nutricionales, ambiente, enfermedades previas, entre otras), y el estado inmunológico (Callan y Garry, 2002). Los factores de riesgo ambientales incluyen: clima, temperatura ambiental, partículas de polvo, densidad poblacional, humedad, ventilación y la distancia de embarque. Los factores epidemiológicos incluyen agentes microbiológicos, modo de transmisión, estado parasitario del hospedero, periodos de infección, latencia y periodos de portadores así como la virulencia del agente involucrado.

Existen factores anatómicos que predisponen a los bovinos a padecer con mayor facilidad las neumonías causadas por CRB. Dentro de éstas limitantes destacan: ollares pequeños, los cuales limitan el flujo de aire hacia la cavidad torácica; laringe pequeña, la cual se seca e irrita fácilmente; una limitada capacidad de expectoración; la presencia de un ángulo recto entre la tráquea y los bronquios, lo que ocasiona que las secreciones se acumulen en este punto, provocando una obstrucción y dificultad tanto para respirar como para expectorar; pleura poco distensible; y pulmones relativamente pequeños, los cuales resultan en un área de superficie limitada para la difusión del oxígeno.

CRB causa elevadas pérdidas económicas a los productores, reportes en Estados Unidos de América indican que los costos asociados a CRB con prevención, tratamiento, morbilidad y mortalidad se han estimado de 13.90 a 15.57 dólares por cabeza de ganado. Las pérdidas anuales en la industria del ganado de engorda en este país asciende a mil millones de pesos, mientras que costos dirigidos a la medicina preventiva y tratamientos son cercanos a tres mil millones anualmente (Snowder *et al.*, 2007). La mayoría de muertes resultantes del CRB, incluyen: bronconeumonía, y bronconeumonía fibrinosa. A la necropsia se observan diferentes grados de consolidación pulmonar, necrosis, formación de abscesos y depósitos de fibrina (Smith, 2004).

El control de las alteraciones a nivel del tracto respiratorio en lotes de engorde bovino es un parámetro de suma importancia desde de que se convirtió en la causa más común de muerte en éstos, las cuales representan el 57% del total de muertes (Loneragan *et al.*, 2001).

Los virus que prevalecen causando CRB son: el virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB), virus Respiratorio Sincitial Bovino (RSVB) y virus de Parainfluenza Bovina tipo 3 (PIB-3) (Ellis, 2001). En México, la importancia de reconocer la participación de virus en CRB fue reconocida a partir del año 1971, mediante el empleo de estudios serológicos en diferentes estados del país (Trigo, 1987). Estudios realizados por Vilchis y colaboradores en 1985 encontraron rangos de seropositividad en animales de engorda de 19-84% y ganado productor de leche de 20-70% para determinar la infección por IBR; para el caso de PIB-3 en al año 1975 Correa y colaboradores determinaron un 86% de seropositividad en los animales muestreados. Sin embargo la prevalencia y los factores de riesgo pueden cambiar dependiendo de la región en la cual se encuentran los animales, especialmente en la región del trópico donde los sistemas de producción y de manejo son limitados. Datos actuales demuestran en un estudio llevado a cabo en un periodo desde Noviembre del 2007- Marzo 2008

en hatos de doble propósito de Colima la seropositividad determinada mediante la técnica ELISA con anticuerpos dirigidos contra PIV-3 y VRSB siendo éstos de 54% y 50.8% respectivamente (Figuroa-Chávez *et al.*, 2012).

1.1.3.1. Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB)

El VRSB, es un virus relacionado a la presencia de cuadros respiratorios principalmente en ganado joven, denominado así por el efecto citopático que producen *in vitro*, consistente con la formación de sincitios. Se reportan prevalencias a nivel mundial, superiores al 65% (Hagglund *et al.*, 2006), y niveles aún mayores de anticuerpos contra el VRSB, 65% a 85%, han sido reportados, en Estados Unidos, previos a la introducción de vacunas (Baker y Frey, 1985).

No hay evidencias sobre diferencias de susceptibilidad o severidad de enfermedad entre machos y hembras y la infección por VRSB, aparentemente puede observarse en cualquier grupo etario, pero las infecciones que resultan en una enfermedad clínica severa, son típicamente observadas en terneros menores de seis meses. No obstante, también existen reportes de infecciones por VRSB causando signos severos de enfermedad respiratoria en ganado adulto. Las infecciones por VRSB ocurren tanto en ganadería de carne como en lechería, aunque existen reportes que sugieren diferencias en susceptibilidad a la infección y a la enfermedad producida por VRSB entre distintas razas (Valarcher y Taylor, 2007).

1.1.3.1.1. Organización del genoma

El Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB) es un virus envuelto, no segmentado, de RNA con polaridad negativa, y es la principal causa de enfermedad respiratoria en ganado joven, terneros. VRSB es miembro del Genero *Pneumovirus* dentro de la Subfamilia *Pneumovirinae*, Familia *Paramixoviridae* del Orden de los Mononegavirales. La morfología del virion de

VRSB mediante microscopia electrónica parece ser muy pleomórfica con una forma redondeada y un diámetro entre 150 y 35 nm, o filamentoso con una longitud que puede alcanzar 5 um y un diámetro entre 60 y 100 nm. A pesar de su estructura, cada partícula infecciosa contiene una copia funcional de genoma.

El virión consiste de una envoltura lipídica, derivada a partir de la membrana plasmática de la célula del hospedero, conteniendo tres glicoproteínas de superficie transmembranales codificadas por el virus, las cuales se encuentran organizadas separadamente dentro de las espículas sobre la superficie del virión. Estas glicoproteínas son la glicoproteína grande (G), la proteína de fusión (F) y la proteína hidrofóbica pequeña (SH). La envoltura cubre la nucleocápside helicoidal, la cual consiste de la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína polimerasa dependiente de RNA viral (L) y el RNA genómico de aproximadamente 15000 nucleótidos. Además, la partícula viral contiene proteínas celulares, como lo es actina (Brown *et al.*, 2002; Collins *etal.*, 2001). El genoma de los Pneumovirus se caracteriza por la existencia de dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2, y un solapamiento de transcripción entre M2 y L, que resulta en la síntesis de las proteínas M2-1 y M2-2 (Valarcher y Taylor, 2007).

1.1.3.1.2. *Proteínas virales*

Una de las principales diferencias entre los Pneumovirus de otros Paramixovirus es la presencia de dos proteínas no estructurales (NS), NS1 (136 AA) y NS2 (124 AA) (Pastey y Samal, 1995). Los genes codificantes para estas dos proteínas se transcritas abundantemente en las células infectadas por los virus. Existe evidencia que la proteína NS1 co-precipita con la proteína M y es un fuerte inhibidor de la transcripción del RNA viral y de la replicación (Evans *et al*, 1996; Atreya *et al.*, 1998). La proteína NS2 también parece ser un inhibidor de la transcripción, pero a un nivel menor que NS1. NS2 co-localiza con las proteínas P y N en células infectadas (Weber *et al.*, 1995; Evans *et al.*,

1996). Las proteínas NS1 y NS2 tienen un papel importante en la regulación del INF α/β . La proteína pequeña hidrofóbica (SH), es una proteína pequeña integral de membrana y no es esencial para la replicación viral *in vivo* o *in vitro*. Es de un tamaño de 81 AA y varía en un 13% entre diferentes aislamientos de VRSB (Karger *et al.*, 2001; Belknap *et al.*, 1995; Samal y Zamora, 1993).

La glicoproteína G es de un tamaño de 257 a 263 AA dependiendo del aislamiento de VRSB a partir del cual se obtiene (Mallipeddi y Samal, 1993). Se ha identificado como la principal proteína de ataque, porque anticuerpos específicos dirigidos contra ésta bloquea la unión del virus a la célula y es le principal antígeno protector de VRSB (Levine *et al.*, 1987; Taylor *et al.*, 1997 y 1998). La glicoproteína G es sintetizada de dos formas, una forma anclada a la membrana y una forma secretora, la cual surge a partir de un segundo codón de traducción AUG en el ORF. Cerca del 80% de la proteína G es producida como la forma secretora a partir de 24 horas post infección. La proteína G de VRSB probablemente favorece el ataque del virión hacia la superficie celular mediante la interacción de sus dominios de unión a heparina con los glicosaminoglicanos sobre las membranas celulares (Teng *et al.*, 2001).

La proteína de fusión (F), regula la unión del virus a la célula y es responsable de la penetración del virus a la célula mediante la fusión entre las membranas celulares y virales, liberando la nucleocápside hacia el citoplasma. Es también responsable de la fusión de las membranas celulares entre las células infectadas y la no infectadas dando lugar a la formación de los sincitios o células gigantes multinucleadas. La proteína F incluye anticuerpos neutralizantes y confiere resistencia frente a la infección por VRSB (Taylor *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 1998). Esta proteína es de un tamaño de 574 AA y es altamente conservada en diferentes aislamientos de VRSB (Lerch *et al.*, 1991). Además es indispensable para la replicación viral, se sintetiza a partir de un precursor, F0, el cual ha sido proteolíticamente escindido a dos secuencias consenso de furina, para obtener una fusión activa, unido por un puente disulfuro entre las subunidades F2 y F1.

La nucleocápside está constituida por la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P) y la polimerasa (L). La nucleoproteína tiene un tamaño de 391 AA y la variación entre diferentes aislados de VRSB es de 1.5% y 0.7% a nivel de nucleótido y de AA respectivamente. La proteína N está presente en grandes cantidades en el virión y en células infectadas y posee varias funciones. En combinación con P, L y posiblemente M2-2 la proteína N es el principal elemento de la nucleocápside y protege el genoma viral de RNA de las RNAsas. La proteína P tiene 241 AA y parece que actúa como una chaperona para N soluble y está implicada como un factor de regulación para la transcripción y replicación viral. La polimerasa L de VRSB tiene una longitud de 2162 AA y es una polimerasa dependiente de RNA. Esta proteína es responsable de la transcripción y replicación viral.

Las proteínas de la matriz (M) de una longitud de 256 AA, se localiza en la superficie interna de la envoltura viral y tiene un papel importante en la formación de partículas parecidas a virus. Las proteínas M2-1 y M2-2, son codificadas ambas por el mRNA M2. La proteína M2-1 es un factor anti-terminación que promueve la elongación de la cadena transcrita e incrementa la frecuencia de lectura en las uniones génicas, por otra parte la proteína M2-2 media de forma regulatoria el encendido de la transcripción a la replicación RNA. (Teng y Collins, 1998; Collins *et al.*, 1990; Hardy y Wertz, 1998; Bermingham y Collins, 1999).

1.1.3.1.3. Replicación viral

Tras la fusión de la envoltura viral y la membrana celular, el complejo de la ribonucleoproteína (RNP) es liberado dentro del citoplasma y la transcripción del RNA viral mediante la polimerasa es llevado a cabo. La transcripción involucra una secuencia de mecanismos de inicio y paro que produce RNA subgenómico. Este es guiado por una secuencia señal corta conservada que flanquea cada unidad codificante de RNAm, denominada como un gen señal

de inicio de la transcripción y un gen señal de paro terminación/poliadenización (Kuo *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 1997).

La replicación de RNA ocurre cuando la polimerasa cambia a modo de lectura resultando en la síntesis de un intermediario replicativo de sentido positivo el cual actúa como templado para la replicación de la cadena de RNA genómica de sentido negativo. Ambos RNA genómico y antigenómico son empaquetados. Las nucleocápsides son ensambladas en el citoplasma y después migran junto con la proteína M a través de la membrana celular o en el interior de vesículas citoplasmáticas (Arslanagic *et al.*, 1996).

La formación de las partículas virales de los paramixovirus se da sólo después de que todos los componentes estructurales se han producido, incluyendo las glicoproteínas virales y las ribonucleoproteínas virales (RNPs), ya que estos se ensamblan juntos en sitios específicos de la membrana celular de células infectadas. La proteína viral M es la encargada de organizar este proceso de ensamblaje. Esta proteína viral es muy abundante y se une directamente a la membrana celular ocupando una posición central que alberga la interacción con las RNPs virales de la nucleocápside y también con las glicoproteínas virales a través de los tallos citoplasmáticos de éstas. Por lo tanto la proteína M funciona como un adaptador que se liga junto con los componentes estructurales de los viriones, dirigiendo de esta manera su ensamblaje.

Por otra parte los microdomínios que existen entre las capas bilipídicas como las balsas lipídicas ricas en esfingolípidos y colesterol tienen el potencial de actuar como plataformas para que se lleva a cabo el proceso de ensamblaje a través de provisión de puntos de nucleación para permitir que se concentren las proteínas virales en estos sitios previos a la gemación en conjunto con una interacción activa de la proteína M. A nivel de citoesqueleto la actina se involucra en el proceso de gemación en los paramixovirus.

1.1.3.1.4. Epidemiología

El ganado bovino es el hospedero natural de VRSB, es posible que otras especies animales como los ovinos, caprinos, bisontes, o camélidos pueden ser infectados bajo ciertas circunstancias (Valarcher *et al*, 2001). La distribución de VRSB es mundial siendo aislado el virus en Europa, América y Asia. Este virus provoca brotes regulares durante el invierno de enfermedad respiratoria en el ganado bovino. Estudios previos reportan seroprevalencias que van desde un 30-70% detectados en Ganado bovino (Ames, 1993; Elvander, 1996).

La frecuencia de infecciones por VRSB es correlacionada con la densidad de población bovina del área donde se presentan los casos, así como la edad del animal. VRSB se correlaciona con una elevada morbilidad de 60 a 80% y la mortalidad puede superior al 20% en algunos brotes. Los signos clínicos pueden ser detectados en otoño e invierno en zonas con clima templado (Stott *et al.*, 1980).

1.1.3.1.5. Patogenia

La transmisión de este virus se da principalmente por contacto directo entre animales enfermos y sanos o por medio de aerosoles (Mars *et.*, *al*, 1999). Algunos datos indican que VRSB quizá provoca persistencia en animales infectados (De Long *et al*, 1996; Valarcher *et al*, 2001). El periodo de incubación se estima entre 2 y 5 días. Puede ser asintomática y afectar las vías respiratorias altas, las bajas o ambas. La afección de las vías respiratorias bajas se caracteriza por tos con descarga nasal seromucoides y descarga ocular. En casos mas severos, de la infección, hay presencia de una ligera depresión y anorexia, una disminución en la producción láctea y en el periodo de lactación de las vacas, hipertermia, polipnea (con un rango de 60 movimientos abdominales por minuto) y disnea abdominal. A la auscultación se escuchan estertores o silbidos anormales causados por una bronconeumonía o bronquiolítis (Verhoeff *et al.*, 1984).

Los animales desarrollan dificultad respiratoria severa con gruñidos espiratorios y respiración con la boca abierta con el cuello extendido y la cabeza baja, con escurrimiento de saliva y con la lengua de fuera. En estos animales se puede detectar enfisema pulmonar y edema con algunos estertores y sibilancias (Belknap, 1991). A la necropsia se puede observar neumonía bronco intersticial (Viuff *et al.*, 1996). Áreas de la parte cráneo-ventral del pulmón están consolidadas y se puede presentar descarga mucopurulenta a partir de los bronquios y bronquiolos. Linfonodos traqueo-bronquiales y mediastínicos pueden estar agrandados, edematosos y en algunas ocasiones hemorrágicos. Si ocurre una infección fuerte con bacterias el parénquima pulmonar esta más inflamado y consolidado y se puede observar fibrina o una bronconeumonía supurativa (Bryson, 1993). Las lesiones microscópicas se caracterizan por una bronquiolitis exudativa proliferativa con presencia de colapso alveolar y una infiltración peribronquial con células mononucleares (Thomas *et al.*, 1984). Células gigantes o sincitios pueden estar presentes, en estadios tempranos de manera libre en el lumen de los bronquios, en el epitelio bronquio-alveolar o en las paredes alveolares. Eosinófilos y Linfocitos se pueden observar en la lámina propia.

1.1.3.2. Virus de parainfluenza bovina tipo 3 (VPIB-3)

VPIB3 fue aislado originalmente del ganado con fiebre de embarque y designado como SF-4, también fue llamado myxovirus bovino, ya que era asociado con la mucosidad nasal que presentaban los animales infectados (Reisinger *et al.*, 1959). Desde entonces el virus ha sido recuperado de animales aparentemente sanos, con signos de enfermedad respiratoria y de fetos abortados.

Cuando los animales son sujeto de elevadas condiciones de estrés, la infección con VPIB3 puede contribuir con daño pulmonar en el hospedero así como inmunosupresión dando como resultado una bronconeumonía severa la

cual es originada por acción de infecciones bacterianas secundarias. La presentación clínica de la infección con VPIB3 puede variar considerablemente, con un rango de enfermedad que va de infección asintomática a enfermedad respiratoria severa. En la mayoría de los casos donde se encuentra involucrado VPIB3 los signos clínicos usualmente incluyen, tos, fiebre y descarga nasal (Bryson, 1990).

1.1.3.2.1. Organización del genoma

El virus de la parainfluenza tipo 3 (VPI3) es un virus de cadena simple de RNA con sentido negativo, dentro del genero *Respirovirus* de la familia *Pamixoviridae* del orden de los Mononegavirales. El genero de los *Respirovirus* incluye los virus de la parainfluenza humana tipo 1 y 3, el virus Sendai, y el virus de la parainfluenza bovina tipo 3 (VPIB3). Actualmente en base a análisis genéticos y filogenéticos se encuentran descritos tres genotipos, A (VPIB3a), B (VPIB3b) y C (VPIB3c), (Zhu *etal.*, 2011).

1.1.3.2.2. Proteínas virales

El VPIB-3 codifica para nueve proteínas a partir de seis genes continuos. Estas nueve proteínas incluyen las tres proteínas asociadas a la nucleocápside, la nucleoproteína (N) que envuelve el RNA viral, la fosfoproteína (P), y la proteína polimerasa larga o grande (L) que es multifuncional liga a P y tiene un papel en la transcripción del RNA, las cuales forman el complejo de la nucleocápside y la polimerasa asociada; una proteína interna de matriz (M) la cual tiene un rol indefinido en el ensamblaje del virion y empaquetamiento del RNA; y las glicoproteínas de envoltura de fusión (F) responsable de la fusión celular y hemólisis, que posibilita la infección por el virus (Drumen *et al.*, 1999) y la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) responsable de la hemoaglutinación y actividad Neuraminidasa, con un 75% de identidad en secuencias a nivel de aminoácidos en virus humano y bovino (Bailey *et al.*, 2000).

La fosfoproteína a su vez codifica para tres polipéptidos adicionales a través del uso de un marco de lectura abierto alterno, la proteína accesoria C, o mediante la inserción de nucleótidos en una pseudoplantilla de RNA de edición para la generación de las proteínas accesorias V y D. A través de estudios analógicos con otros virus de parainfluenza una o más de las proteínas accesorias de estos virus podrían estar involucradas en la regulación de la síntesis de RNA y en la función de antagonistas frente a la respuesta antiviral de interferón por parte del hospedero (Skiadopoulos *et al.*, 2003). A su vez la región de acción-cys de transcripción y la de control de replicación están altamente conservadas entre estos virus, y el nivel de identidad con base en la secuencia de aminoácidos entre las proteínas homologas entre estos virus es de un rango aproximado de 59%, para la proteína P, y de 90% para la proteína M (Bailly *et al.*, 2000).

Las proteínas estructurales del virus de parainfluenza humana y bovina son similares en número y tamaño. Y poseen actividad biológica similar, tanto en la actividad de la hemaglutinina y la Neuraminidasa así como en la fusión de membrana. Análisis realizados sobre el patrón de reactividad antigénica *in vitro* en presencia de anticuerpos monoclonales y de aislamientos de muestras clínicas de PIV3 indicaron que existen por lo menos 11 epítopos distintos que son detectados sobre la molécula de HN, de los cuales seis son conservados y cinco son variables (Coelingh *et al.*, 1986). Teniendo esta proteína seis sitios antigénicos (A-F) de los cuales, los epítopos que se encuentran en los sitios A, D, y F son conservados en la glicoproteína HN de virus de parainfluenza bovinos y de humanos.

VPIH3 y VPIB3 comparten niveles moderados a elevados de nucleótidos e identidad en la secuencia de aminoácidos y son relacionados antigénicamente un 25% mediante estudios de neutralización. La cepa Kansas de VPIB-3 se encuentra restringido en replicación al tracto respiratorio de los humanos y de los primates, la cual ha sido evaluada como candidata para la elaboración de

vacunas en humanos, dirigida principalmente a la población infantil. Los anticuerpos neutralizantes dirigidos hacia la glicoproteína F y HN tienen un papel importante en la resistencia contra la infección de PIV3 en humanos y la respuesta por parte de células T del sistema inmune parecen tener suma importancia en la resolución de la enfermedad (Pennathur *et al.*, 2003). (Proteína F media la formación de sincitios *in vitro*).

1.1.3.2.3. *Replicación viral*

El primer evento que se da en la replicación viral de VPIB3 es la fusión del virus con la membrana lipídica de la célula hospedera, posteriormente se da la liberación de la nucleocápside hacia el citoplasma celular. Una vez en el citoplasma, la transcripción se lleva a cabo mediante el uso del RNA dependiente de RNA polimerasa viral (proteína L). La maquinaria ribosomal celular posteriormente traduce el mRNA viral a las proteínas virales. Este proceso se lleva a cabo en la totalidad del genoma viral, primero en una hebra de sentido positivo de RNA y posteriormente en la hebra de sentido negativo. Una vez producido, estas cadenas individuales en sentido negativo de RNA son introducidas a la cápside con la NP y puede ser utilizado en nuevas rondas de transcripción y replicación viral o pueden ser empaquetadas para ser exportadas en un nuevo virión.

1.1.3.2.4. *Epidemiología*

Las infecciones por los virus de parainfluenza tipo 3 se han encontrado en una amplia variedad de mamíferos incluidos entre éstas el ganado bovino, los humanos, ovejas (Lyon *et al.*, 1997), cabras (Yener *et al.*, 2005), visón (Zarnker *et al.*, 1990), cerdos de guinea, rinocerontes blancos y negros (Fischer-Tenhagen *et al.*, 2000), alce (Thorsen *et al.*, 1971) y camellos (Karrar *et al.*, 1979). Se han reportado diferentes casos de infecciones cruzadas entre especies, incluidas parainfluenza humana tipo 3 en cerdos de guinea (Ohsawa *et al.*, 1998), VPIB-3 en humanos y ovejas y VPI3 ovino en ganado bovino

(Stevenson *et al.*, 1970). Además se ha reportado serología positiva en animales domésticos y camélidos silvestres de América del Sur aunado al aislamiento del virus a partir de ganado bovino, ovino y búfalos de agua en Argentina (Maidana *et al.*, 2012). En México es poca la información que existe con respecto al diagnóstico e identificación de VPIB3. La prevalencia que se ha registrado en el país con base en análisis de anticuerpos va de un rango de 19 a 96% (Trigo, 1987; Barajas, 1995; Matus *et al.*, 1995; Morales *et al.*, 1998); Solís-Calderón y colaboradores en el 2007 reportaron 85% de seropositividad en ganado bovino en el Estado de Yucatán.

1.1.3.2.5. Patogenia

Por lo general afecta animales que oscilan entre 2 semanas y los 12 meses de edad (Karhs, 1981). Se piensa que la infección por aerosoles y el contacto directo con las secreciones nasales de animales enfermos son las formas de transmisión de este virus, y ambos se acentúan en condiciones de hacinamiento y ventilación inadecuada (Drunen *et al.*, 1999). Puede persistir durante varias semanas, afectando a los macrófagos alveolares al inhibir la función de los lisosomas y fagosomas, impidiendo los mecanismos de depuración pulmonar, este daño al epitelio crea un ambiente ideal para el establecimiento de invasores bacterianos secundarios como *Mannheimia haemolytica* que es una de las bacterias patógenas más importantes del tracto respiratorio en los rumiantes domésticos (Fulton *et al.*, 2003). En casos fatales puede ser recuperado de pulmón, tráquea, laringe y nódulos linfáticos del tracto respiratorio. Las lesiones macroscópicas consisten en leve rinitis con secreción serosa o mucopurulenta, se observan áreas multifocales de colapso o de consolidación localizados en los lóbulos anteriores de los pulmones de la región craneo ventral. El curso de la enfermedad varía entre 4 a 12 días, por lo general de curso subclínico. En cultivo celular induce efecto citopático (ECP) caracterizado por la formación de filamentos citoplasmáticos, espacios intranucleares e inclusiones citoplasmáticas (Olsen *et al.*, 1984).

1.1.3.3. *Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)*

Los virus de este género infectan artiodáctilos (mamíferos ungulados) y cruzan la barrera entre especies (Ridpath, 2009). El virus de la Diarrea Viral Bovina es un patógeno importante dentro de la industria del ganado bovino caracterizado por generar significantes pérdidas económicas. Las infecciones de VDVB por lo general causan signos clínicos como inapetencia, diarrea leve, descarga ocular-nasal, lesiones orales, fiebre transitoria o disminución en la producción láctea, formas graves de diarrea, pirexia (Backer, 1995). También se han descrito diversos brotes de síndromes hemorrágicos. El mayor daño causado al interior de las unidades de producción ganaderas, es derivado de las infecciones transplacentarias (Houe, 1999); los signos clínicos que se manifiestan son: abortos, momificaciones, defectos congénitos, terneros nacidos muertos, debilidad al nacimiento o terneros persistentemente infectados (PI).

1.1.3.3.1. *Organización del genoma*

Los pestivirus son virus envueltos de forma esférica: Su genoma es de una sola cadena de RNA con sentido positivo de un tamaño aproximado de 12.3 kb. El marco de lectura abierto grande (ORF) codifica para una poliproteína de alrededor de 3900 aminoácidos y se encuentra flanqueada por el extremo 5' UTR y la región 3' no traducible (UTR).

La clasificación adecuada de los pestivirus se realiza en base a sus características genéticas y antigénicas (Becher *et al* 1999). El género *Pestivirus* pertenece a la familia *Flaviridae* el cual incluye las siguientes especies: virus de la diarrea viral bovina 1 (VDVB-1), virus de la diarrea viral bovina tipo 2 (VDBV-2), virus de la enfermedad de las fronteras (BDV) y virus de la fiebre porcina clásica (CSFV). Recientemente, algunos aislamientos a partir de suero fetal bovino contaminado, de un búfalo PI en Brasil y de jirafas en Kenia ha llevado a sugerir la presencia de un tercer genotipo VDVB3 (Ridpath J, 2009). Estos nuevos aislamientos son muy similares a los genotipo 1 y 2 del VDVB de

acuerdo a su homología con las regiones del genoma: 5'UTR, Npro y E2 (Liu *et al*, 2009; Ávalos-Ramírez *et al*, 2001).

1.1.3.3.2. *Proteínas virales*

La poliproteína sintetizada del VDVB, es co y postraduccionalmente procesada por acción de proteasas virales y celulares originando de once a doce proteínas estructurales y no estructurales. Npro es una proteína no estructural autoproteasa amino terminal, la cual se autocataliza postraduccionalmente para liberarse de la proteína de la cápside. Diversos estudios sugieren que puede actuar como antagonista del interferón tipo 1 (INF 1), y por lo tanto jugar un papel importante en el establecimiento de la infección persistente y de la inmunotolerancia. (Hilton *et al.*, 2006). La proteína C o core (14 kDa) procesada en su extremo N-terminal por la proteína Npro previo al ensamblaje del virión, tiene afinidad por el RNA y capacidad de empaquetar el genoma viral (Murray *et al.*, 2008; Riedel *et al.*, 2012).

La glicoproteína de envoltura Erns (E0), con función de RNAsa (ribonucleasa secretada) es el primer contacto con la célula a través de su extremo carboxilo terminal, ya que tiene afinidad por los glicosaminoglicanos, también esta asociada a la inhibición de síntesis de proteínas para la proliferación celular de linfocitos y se cree que induce apoptosis selectiva en linfocitos de varias especies animales debido a su acumulación en la membrana, lo que conduce a una inmunosupresión (Fetzer *et al.*, 2005; Wegelt *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2002). La glicoproteína E1 de anclaje a la membrana forma heterodímeros con E2 los cuales son esenciales para la entrada del virus a la célula hospedera (Weiland *et al.*, 1999; Ornari *et al.*, 2013).

La glicoproteína E2 de 370 AA, localizada en la envoltura del virión tiene un función clave en la unión con los receptores de la superficie celular, siendo su principal ligando CD46 bovino (perteneciente a la familia de los reguladores de la activación del complemento, presente en diversas células como: polimorfonucleares, linfocitos, monocitos, células endoteliales y epiteliales de

animales ungulados) (Krey *et al.*, 2006; Christmas *et al.*, 2006; Peternahns *et al.*, 2010). Esta proteína además de participar en la fusión de la membrana, el ensamblaje de los virus así como en la maduración de los viriones, también es genética y antigénicamente la más variable y mutante; dando origen a nuevas cepas que faciliten el mantenimiento de infecciones persistentes, ya que puede generar poblaciones heterogéneas de viriones, o quasiespecies que contribuyen a la evasión de la respuesta inmunológica (Bassett *et al.*, 1999; lackner *et al.*, 2005).

La proteína p7 funciona como enlace entre proteínas estructurales y no estructurales, se ha identificado que p7 interactúa con la proteína de la cápside para iniciar el proceso de gemación, mediante un dominio citoplasmático, aunado a esta característica posee una estructura similar a una viroporina que ayuda a la permeabilización de la membrana facilitando la liberación de la progenie viral (Harada *et al.*, 2000).

La cisteína proteasa NS2, responsable del procesamiento de NS2/3, siendo ésta escisión esencial para la replicación del RNA de los pestivirus siendo regulada su eficiencia por una chaperona celular, la cual determinara su citopatogenicidad viral (Lackner *et al.*, 2006). Otra función que tiene ésta proteasa es en el ensamblaje del virus . NS3 se caracteriza por la proteína más conservada en los pestivirus e induce un alto título de anticuerpos neutralizantes post infección o post vacunación (Bolin y Ridpath, 1998). Posee un dominio N-terminal, que funciona como serina proteasa, responsable del procesamiento de la poliproteína y de la supresión de la replicación del RNA; posee un dominio C-terminal el cual funciona como RNA helicasa y ATPasa, siendo importantes éstas funciones en la replicación del RNA (Borowski *et al.*, 2002; Kabongo *et al.*, 2005; Lindenbach *et al.*, 2007). La proteína transmembranal NS4A interactúa con proteínas virales como NS3 y con factores involucrados en la replicación viral. NS4B esta relacionada con la replicación del genoma del VDVB mediante la interacción con NS3 y NS5, lo que hace suponer que es parte del complejo de replicación (Qu *et al.*, 2001).

La proteína no estructural NS5A esta involucrada en el reclutamiento de componentes esenciales en a replicación viral, durante la replicación del RNA (Jhonson *et al.*, 2001); NS5B ha sido identificada como una polimerasa dependiente de RNA (Zhong *et al.*, 1998).

1.1.3.3.3. Biotipos

El VDVB es propenso a modificaciones genómicas como mutaciones y recombinaciones (Bolin, 2004). Esta variabilidad del virus se ha asociado en parte a la RNA polimerasa viral la cual no corrige los nucleótidos mal incorporados en la replicación viral (Hamers *et al.*, 2001), dando como resultado la aparición de dos biotipos: el citopático (cp) y el no citopático (ncp) que se diferencian por su habilidad de causar muerte celular en cultivos celulares *in vitro*. Análisis moleculares del genoma de los biotipos citopáticos (cp) han establecido, que estos surgen o evolucionan de los biotipos no citopáticos. La habilidad de generar mutantes de los virus, ha permitido que puedan adaptarse rápidamente a las respuestas del huésped y, en ocasiones establecer la enfermedad crónica o persistente (Bolin, 2004).

La recombinación genética puede surgir cuando 2 viriones infectan una misma célula (Hamers *et al.*, 2001). Los re-arreglos encontrados en los biotipos cp incluyen: inserciones celulares, duplicaciones o deleciones de la secuencia viral (Becher *et al.*, 1998). Estos se han observado principalmente en la región del genoma que codifica la proteína NS2-3, donde introducen un sitio de clivaje resultando en el procesamiento de la proteína NS2-3 en NS3 (Hamers *et al.*, 2001). Entre los ejemplos de rearrreglos se tiene: la inserción de la secuencia celular de Ubiquitina (Ub) adyacente al extremo N terminal de la NS3, deleciones de secuencias del genoma como la deleción desde la secuencia que codifica para la proteína C hasta la NS2, lo que hace que la Npro se fusione directamente con la NS3. Estos rearrreglos generan el clivaje de la proteína NS2-3 por la actividad proteolítica de la Npro (Méndez *et al.*, 1998). La

proteína NS3 se considera, como la causante de inducir el efecto citopático (Ridpath J, 2005).

El biotipo cp induce destrucción masiva celular mediante la formación de vacuolas citoplasmáticas con la muerte de las células pocos días después de la infección (Benfelt *et al*, 2003). La destrucción celular generada por el VDVB se ha asociado con la acumulación de grandes cantidades de RNA viral en la célula, activación de las caspasas iniciadoras (caspasa 9 y 8) por parte de la proteína NS3 y estrés en el retículo endoplásmico al emplearlo en el procesamiento de sus proteínas (St- Louis *et al*, 2005).

El biotipo ncp prevalece más en la naturaleza. No causa efectos visibles en las células. Se ha establecido que algunos virus como mecanismo de evasión contra el sistema inmune del organismo apagan una de las respuestas más comunes ante una infección viral: la apoptosis. El mecanismo aún es desconocido, pero se cree que es debido a la capacidad de inhibir la vía de las caspasas. En el caso de los biotipos no citopáticos del VDVB se ha observado una sobre expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2 (Benfelt *et al.*, 2003, Ridpath J, 2005).

1.1.3.3.4. Genotipos

La mayoría de los análisis filogenéticos del virus de la diarrea viral bovina han sido en base a la región 5'UTR del genoma viral, pero también sobre la porción N-terminal de la autoproteasa (Npro) y sobre la proteína estructural de la envoltura E2 (Hornberg *et al*, 2008). Los genotipos presentan una homología aproximadamente de 60%, las diferencias se encuentran restringidas a tres zonas hipervariables, dos de las cuales están en la región gp53/E2 y la otra en la región 5' UTR (Ridpath *etal*, 2000).

VDVB puede ser subdividido en tres genotipos VDBV-1, VDVB-2 y VDVB-3 (Liu *et al.*, 2009). Mediante estudios de tipificación genética de VDVB-1 a partir

de diferentes países se han revelado por lo menos doce subtipos (1a- 1l) y VDVB-2 se encuentra dividido en cuatro subtipos diferentes (2a-2d), Estos, presentan una homología entre el 80 al 85%.

Los dos biotipos se encuentran presentes en los dos genotipos (Bolin S, 2004). VDVB-1 causa fiebre, diarrea, neumonía, lesiones en mucosas y leucopenia. VDVB-2 se ha asociado con el síndrome hemorrágico caracterizado por la presentación de fiebre alta, leucopenia, trombocitopenia, diarrea y muerte en terneros adultos (Kelling *et al.*, 2001). La reacción cruzada entre uno y otro genotipo es muy baja lo que dificulta las metodologías diagnósticas y la generación de vacunas, a diferencia de los subgenotipos del mismo genotipo que presentan mayor reactividad (Ridpath J., 2005).

1.1.3.3.5. Replicación viral

El genoma del VDVB carece de dos estructuras típicas encontradas en los extremos terminales de la mayoría de los RNAm de las células eucariotas: la región cap en el extremo 5' y la cola poli A en el extremo 3'. En el extremo 5' sin traducir se encuentra una secuencia de 370 nucleótidos no codificable que imita la estructura CAP, esta funciona como un sitio interno de entrada ribosomal (IRES) que favorece la transcripción de la poliproteína viral. Estos elementos IRES fueron inicialmente identificados dentro del RNA de los picornavirus, posteriormente se identificaron en otros virus (Hellen, 2007).

Aunque los eventos iniciales del ciclo de infección del VDVB no son bien conocidos (Hulst *et al.*, 2001); se ha mostrado que la adhesión y entrada viral se lleva a cabo en dos pasos (Iqbal *et al.*, 2000). El primero, consiste en la interacción o unión de la Erns con un receptor de la superficie celular desconocido; y el segundo, la interacción de la E2 con una molécula más específica en la superficie, necesaria para mediar la penetración de las células (Hulst *et al.*, 2001; Iqbal *et al.*, 2000).

Varias proteínas de superficie se han identificado como receptores para los pestivirus, pero ninguna se ha caracterizado bien. Mediante el empleo de anticuerpos anti-idiotípicos dirigidos contra las dos proteínas de la envoltura implicadas en el proceso de adhesión y penetración, se ha evidenciado que los glicosaminoglicanos de la superficie celular (GAGs) pueden servir como receptores para la Erns, y en el caso específico de la E2 se ha observado una proteína de superficie de 50kDa como receptor específico (Iqbal *et al.*, 2000). También, se han sugerido otros posibles receptores para la E2 como el receptor de baja densidad lipoproteico y una proteína de superficie de unión de actina de 60kDa (Iqbal *et al.*, 2000).

Luego de adherirse y penetrar en la célula huésped, el virus ingresa al citoplasma por un proceso de endocitosis mediado por pH ácido y libera su genoma. Al liberarse el RNA viral en el citoplasma actúa como un mRNA, éste entra en contacto con los ribosomas en la subunidad 40S mediante un dominio específico en el extremo 5'UTR (IRES) para iniciar la traducción (Hulst *et al.*, 2001).

Este virus utiliza el retículo endoplásmico de la célula como sitio primario para el procesamiento de proteínas, biogénesis de las glicoproteínas de la envoltura y formación del virión (St-Louis *et al.*, 2005). El RNA viral es traducido en una poliproteína que es posteriormente procesada por enzimas virales y celulares (endoproteasas) en los diversos polipéptidos (proteínas estructurales y no estructurales) (Agapov *et al.*, 2004).

La replicación del genoma viral se da por la RNA polimerasa dependiente del RNA viral, la cual produce bandas complementarias al genoma pero de sentido negativo, posteriormente, la polimerasa viral usa esta planilla negativa para sintetizar nuevas moléculas de RNA positivo las cuales son encapsidadas para formar nuevos viriones (Hamers *et al.*, 2001, Choi *et al.*, 2006). Cada célula infectada libera entre 100 a 1000 viriones que alcanzan el medio extracelular mediante exocitosis (Hamers *et al.*, 2001).

1.1.3.3.6. Epidemiología

El VDVB se aisló por primera vez en los años de 1940 (Olafson y Rickard, 1974) y a partir de este descubrimiento se empezaron a aislar a nivel mundial. En contraste, VDVB-2 fue descubierto en los años 1990, siendo identificado por primera vez en América del Norte (Ridpath *et al.*, 1994). En años recientes también se encontró en Europa (Tajima *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2001; Couvreur *et al.*, 2002; Vilcek *et al.*, 2003), Japón (Nagai *et al.*, 2003), Corea (Park *et al.*, 2004) y América del Sur (Jones *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2002; Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

1.1.3.3.7. Patogenia

Una de las características más importantes de este virus es su alta frecuencia de mutación y la tendencia a la recombinación, lo que ha llevado a una gran diversidad genética y antigénica, este problema se ve reflejado en las múltiples manifestaciones clínicas. De esta manera, la infección del ganado con el VDVB puede resultar en uno de tres síndromes: Diarrea viral bovina (o infección postnatal primaria), la infección persistente y la enfermedad de las mucosas (Potgieter , 1996). Así mismo, la alta variabilidad genética dificulta el control de la enfermedad (Bolin ,2004).

El alcance de la infección depende del momento en que se infecta la madre con respecto al periodo de gestación. El ganado bovino PI es inmutotolerante a VDVB, y se encuentra eliminando el virus a lo largo de su vida. Por lo tanto son el principal reservorio del virus y la principal fuente de infección así como de transmisión. Las super infecciones de animales PI inducen a la presentación de la enfermedad de las mucosas la cual es fatal, caracterizada por diarrea profusa y acuosa, anorexia, pirexia, debilidad y lesiones orales (Baker, 1995).

El VDVB, presenta tropismo por las células mitóticamente activas como las células epiteliales, los linfocitos y los mononucleares (Jaime, 1996). Se han establecido diferencias en el tropismo celular dependiendo del biotipo actuante. De esta manera, se ha observado que los biotipos no citopáticos prefieren leucocitos, órganos linfoides y células del tracto respiratorio mientras que los biotipos citopáticos se restringen más al tracto digestivo (Hamers *et al.*, 2001).

Aparte de las diferencias entre los biotipos a nivel de cultivo celular, también se han observado diferencias en la respuesta inmune del huésped infectado. Entre estas diferencias se tienen la producción de interferón (INF) por parte del organismo. Una vez entra al huésped, el VDVB cp induce la producción de INF α , a diferencia del biotipo ncp que parece inhibir la producción de este (Brackenbury L *etal*, 2003). Este bloqueo en la producción de interferón por parte del biotipo ncp es una de la hipótesis en la generación de animales persistentemente infectados (Chase *et al.*, 2004; Schweizer *et al.*, 2001).

El VDVB puede mantener periodos prolongados de infección en sitios del organismos denominados inmunoprivilegiados. Evidencias indican que las infecciones por pestivirus pueden ser prolongadas en ovarios, tejido testicular y tejido del sistema nervioso central. Ha sido aislado a partir de complejos de cúmulos de oocitos, fluidos foliculares, células de la granulosa y células tubulares uterinas a partir de animales que presentaron infección aguda ó que eran persistentemente infectados con VDVB (Bielanski *et al.*, 1998; Tsuboi *et al.*, 1998) y se han detectado anticuerpos en fluidos foliculares (Galik *et al.*, 2002). También se ha demostrado la presencia de VDVB en muestras de semen de sementales infectados de manera aguda y persistente, los cuales pueden transmitir la enfermedad vía inseminación artificial (Meyling *et al.*, 1998).

Estudios demuestran que VDVB puede ser detectado a nivel de sistema nervioso central de animales persistentemente infectados (Montgomery *et al.*, 2008). Blas-Manchado y colaboradores en el 2004, reportaron un caso con

antecedentes de enfermedad a nivel de sistema nervioso central (duración de 48 horas) en una vaca de quince meses de edad. Mediante el uso de la inmunohistoquímica se sugiere que una cepa viral de diarrea viral bovina tipo 2 cruzó la barrera hematoencefálica y se diseminó en el cerebro dando como resultado necrosis neuronal (Oem *et al.*, 2010).

Los programas de control empleados por los diferentes países se fundamentan en gran medida en la eliminación de la principal fuente de infección: los animales persistentemente infectados (PI), ya que estos constituyen los reservorios asintomáticos de la enfermedad; así como en mejorar la respuesta inmune mediante el empleo de vacunas (Lindberg A, 1999).

1.1.3.4. VIRUS HERPES BOVINO TIPO 1

El HVB-1 es responsable de pérdidas significativas en relación al CRB y también con la restricción del mercado internacional, debido a los problemas reproductivos que ocasiona. El HVB-1 participa en el desarrollo del CRB iniciando el cuadro mediante la inmunosupresión del ganado bovino infectado. Además induce frecuentemente inmunosupresión desencadenando en infecciones bacterianas secundarias (con *Pasteurella multocida*, *Manhemia haemolytica* y *Haemophilus somnus*) los cuales pueden causar neumonía. El incremento de la susceptibilidad se correlaciona con infecciones secundarias por una disminución de células mediadoras de la inmunidad después de la infección con HVB-1.

Un aspecto importante en la patogenia de los herpesvirus es la latencia. La cual se define como un periodo de infección persistente restringida a un hospedero, pero con replicación viral recurrente. La replicación viral recurrente puede desencadenar en la transmisión y el mantenimiento de una respuesta inmune antiviral detectable. Por lo tanto, las infecciones latentes en hospederos

clínicamente normales proveen un reservorio potencial no identificado para la transmisión viral.

1.1.3.4.1. Organización del genoma

El herpesvirus bovino tipo 1 es perteneciente al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, genero *Varicellovirus*. La morfología de los viriones del HVB-1 se basa en una cápside icosaédrica simétrica, una envoltura viral obtenida a partir de la membrana celular del hospedero la cual contiene proteínas virales y un tegumento, con numerosas espículas de glicoproteínas como matriz, el cual conecta la cápside a la envoltura viral. El ciclo de replicación viral es corto y se caracteriza por inducir principalmente una infección latente, la cual no es exclusiva de neuronas (Muylkens *et al.*, 2007)

El genoma del HVB-1 es una molécula lineal de DNA de doble cadena, el cual presenta arreglos genómicos de la clase D, con una longitud de 135.3 kb. Los genomas de la clase D comprende dos secuencias únicas, una larga única (U_L) y otra única corta (U_S), ésta última se encuentra flanqueada por un bloque de secuencias repetidas invertidas (repetidos internos, IR) y otro de secuencias invertidas terminales (repetidos terminales, TR). Se han identificado un total de 73 marcos abiertos de lectura (ORF), (Schynts *et al.*, 2003).

1.1.3.4.2. Proteínas virales

El genoma contiene diez genes que codifican para sus respectivas glicoproteínas. Seis se encuentran en la U_L gK (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10), gL (UL1) y los cuatro restantes se localizan en U_S gG (UL4), gD (UL6), gI (US7) y gE (US8). UL49.5 puede considerarse como una falsa glicoproteína, la cual no es glicosilada en el HVB-1, pero en otros alfaherpesvirus se conoce como gN (Lipinska *et al.*, 1988; Mettenleite, 2002). Los genes de HVB-1 se clasifican en dos grandes categorías: no esenciales, lo

cuales permiten el crecimiento al menos *in vitro* al ser deletados en virus mutantes y genes esenciales los cuales al ser deletados en virus mutantes desencadenan en viriones letales no replicativos (Liang *et al.*, 1997; Schroder *et al.*, 1997; Schroder *et al.*, 1999). Un gen es exclusivo de HVB-1 (UL 0.5), mientras que otros como el gen *circ* esta presente en todos los *Varicellovirus*. (Delhon *et al.*, 2003). La gD se considera esencial en VHB-1, mientras que gE se considera no esencial (Baranowsky *et al.*, 1996; Muyikens *et al.*, 2006; Rebordosa *et al.*, 1996).

1.1.3.4.3. Replicación viral

El proceso de replicación del HVB-1 en células que son permisivas es iniciado por tres pasos durante la entrada del virus a la célula. La primer interacción involucra un proceso de ataque del virus con baja afinidad entre la gB y la gC hacia las estructuras de la superficie celular como son los motivos de heparan sulfato (Li *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 1991; Okasaki *et al.*, 1994a; Okasaki *et al.*, 1994b). Esto es seguido de la unión estable de la gD del HVB-1 hacia receptores celulares específicos como los receptores de nectina-1 (miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas) para facilitar la entrada del virus (Geraghty *et al.*, 1998; Campadelli-Fiume *et al.*, 2000), la cual se da por la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática y para que todo esto se lleve a cabo se requiere la interacción de otras cuatro glicoproteínas: gD, gB, y el hetero dímero formado por gH y gL (Liang *et al.*, 1995; Ligas y Jhonson, 1988; Gerdts *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 1998).

Dentro del citoplasma celular, las partículas virales del HVB-1 son transportadas, mediante un complejo motor de dineína asociado con microtúbulos, hacia los poros del núcleo para permitir la liberación del DNA viral (Dohner *et al.*, 2002). De las proteínas tegumentarias VP8 es la más abundante durante este proceso, ya que se localiza en el núcleo inmediatamente después de la infección. La proteína VP16 (proteína 16 del virión) también conocida

como HVB-1 α -TIF (factor de transducción de genes alfa) es encargada del inicio de la expresión de los genes del HVB-1 mediante la activación *trans* de los genes alfa inmediatos tempranos del HVB-1.

La cascada de expresión de genes virales tempranos (E) y tardíos (L) es de forma cinética y sucesiva a los inmediatos tempranos (IE) (Wirth *et al.*, 1991). Éstos genes en conjunto codifican para proteínas involucradas en la regulación del ciclo de replicación viral, en la replicación del DNA viral y en la morfogénesis de nuevos viriones.

Existen tres proteínas principales producidas por IE (BICP0, BICP4, y BICP22) las cuales activan la expresión de genes E y permiten que la replicación del DNA viral continúe. (Jones *et al.*, 2006; Saydam *et al.* 2004; Saydman *et al.*, 2006). La primer oleada de genes tardíos tempranos es iniciada durante la replicación del DNA viral, la segunda oleada de genes tardíos verdaderos es completamente dependiente de la síntesis del DNA viral, ya que los componentes producidos por éstos genes son necesarios para la formación de la nueva progenie viral.

El ensamblaje de los viriones es un proceso complicado el cual inicia con un ensamble primario a partir de la membrana interna del núcleo celular donde se lleva a cabo el empaquetamiento del DNA viral, seguido de un segundo empaquetamiento con la membrana externa nuclear, para que se facilite su desplazamiento a través del citoplasma, este proceso es llevado a cabo principalmente por acción de la kinasa viral US3 (Reynolds *et al.*, 2002), la cual se acumula en el espacio perinuclear. Una vez translocada al citoplasma, la cápside desnuda adquiere su tegumento y una segunda envoltura mediante gemación dentro de los compartimientos del aparato de Golgi (Mettenleiter *et al.*, 2002) donde se lleva a cabo el proceso de maduración final de los viriones y también el rearreglo de aquellas partículas virales defectivas y finalmente la salida de los viriones a través del sistema de secreción y exportación del Aparato de Golgi.

1.1.3.4.4. Patogenia

La vía de entrada natural del virus es a través de la membrana de la mucosa de las vías respiratorias, del tracto urinario y también puede darse la entrada del virus por vía conjuntival. La vía común de transmisión es nasal-nasal; para que se lleve a cabo la transmisión genital es necesariamente por monta directa o por inseminación artificial con semen contaminado con el HVB-1. La gC es considerada primer glicoproteína que interactúa con las células del hospedero, se ha postulado que variaciones a nivel de secuencia en esta proteína favorecen un shift genético en HVB-1 para la presentación de la vulvovaginitis postular infecciosa a rinotraqueítis infecciosa bovina (Rijsewijk *et al.*, 1999).

Una vez que el virus penetró la célula inicia el ciclo de replicación lítico, para dar origen a nueva progenie viral, el efecto citopático del HVB-1 corresponde al redondeamiento de las células, formación de cuerpos de inclusión intranucleares. La muerte celular se da como resultado de la inducción de apoptosis y necrosis durante el ciclo de replicación viral, proceso en el cual esta involucrada principalmente la gD. Una vez que se originaron nuevas partículas virales se diseminan al organismo hacia diferentes tejidos y órganos mediante viremia y eventualmente por neuroinvasión (Hanon *et al.*, 1998; Engels y Ackermann, 1996). La infección con HVB-1 puede disminuir la actividad de los macrófagos alveolares y neutrófilos polimorfonucleares (Leite *et al.*, 2005).

En el ganado joven las manifestaciones clínicas son fiebre 3.4 días con picos de 41°C, apatía, anorexia. En vacas lecheras adultas hay una disminución en la producción láctea además de signos respiratorios y oculares, los cuales se hacen evidentes de 2 a 3 días post infección; los signos clínicos apreciables incluyen: mucosa nasal roja, descarga nasal de serosa a mucopurulenta, respiración acelerada y aumentada, tos, conjuntivitis, y descarga ocular mucopurulenta. El aborto es una consecuencia de la infección respiratoria, de una vaca serogenativa, el cual se presenta entre los cuatro y

ocho meses de gestación, además puede inducir muerte embrionaria a los 3 meses de gestación (Chow *et al.*, 1964; Miller y Van der Maaten 1984).

1.1.3.4.5. Latencia

Los pasos del ciclo de reactivación-latencia se han dividido en tres pasos principales: establecimiento de la latencia, mantenimiento y reactivación. El establecimiento de la latencia incluye la entrada del genoma viral hacia las neuronas sensoriales en la infección aguda. La expresión viral de los genes posteriormente es nula, con la excepción de la expresión del transcrito asociado a la latencia (LAT).

El mantenimiento de la latencia es una fase en la cual dura toda la vida del hospedero la cual se puede definir operacionalmente como el periodo cuando el virus infeccioso no es detectado mediante técnicas convencionales de aislamiento. En general, la expresión abundante de los genes virales que son requeridos para una infección productiva no se lleva a cabo. LAT es el único transcrito que es expresado en abundancia durante este estado de latencia. La reactivación a partir de la latencia es iniciada a través de un estímulo externo (estrés e inmunodepresión, por ejemplo) la cual estimula la expresión de los genes virales. La expresión continua de los genes virales es detectada en neuronas sensoriales, y los virus infecciosos pueden aislarse a partir de tejido ganglionar (TG), hisopados de ojos o nasales. La habilidad de que los herpesvirus (HVB-1) se reactiven a partir de latencia resulta en enfermedad y transmisión de virus.

Durante la latencia ocurren dos cambios en la organización del genoma viral que quizá influyen en la expresión de genes virales. Primero, el genoma viral está presente como un episoma circular. Segundo, el genoma viral se encuentra asociado a histonas celulares y entonces existe como cromatina en la infección latente en neuronas.

1.1.3.5. Virus de la Leucosis Viral Bovina (VLVB)

1.1.3.5.1. Estructura del genoma

Los retrovirus poseen tres genes estructurales: gag, pol, env. La región gag origina tres proteínas: la proteína de matriz (MA), de la cápside (CA) y proteínas de unión a los ácidos nucleicos. La región pol, codifica una proteasa (PR) responsable de escindir las poliproteínas del virus y una transcriptasa reversa (TR). La región env codifica una proteína de superficie (PS) y una proteína transmembrana (PM).

1.1.3.5.2. Replicación viral

La replicación de los retrovirus es bifásica. En la primera depende en su totalidad de los productos génicos del virus, que se une a un receptor específico de la superficie parcialmente caracterizado y penetra al citoplasma donde libera su RNA de la nucleocápside. Aparentemente el receptor de los retrovirus humanos es una estructura proteica, normalmente no presente en la membrana celular, que se expresa transitoriamente en la superficie celular y que depende de la síntesis proteica de *novo*. La codificación genética de este receptor ha sido ubicada en los cromosomas.

A partir del molde de RNA viral y por la TR se sintetiza una versión de DNA proviral que posteriormente se moviliza al núcleo, integrándose de manera aleatoria al genoma de la célula hospedera. La segunda fase, donde utiliza la maquinaria de la célula hospedera, comprende la síntesis y el procesamiento de los genomas virales, de los RNAm y de proteínas. Así el provirus es transcrito a RNA, y luego es traducido y posteriormente los viriones son ensamblados y salen de la membrana celular por gemación.

1.1.4. Diagnóstico de los virus bovinos RSV, PIB-3, DVB, HVB-1 y LVB

El diagnóstico, control y programas de vacunación para las enfermedades virales en estudio dependerá de las características propias de cada agente tomando en cuenta a su patogenicidad, permanencia en el ambiente, virulencia, procesos de coinfección; aunado a la edad, el sexo y el estado fisiológico de los bovinos.

Las infecciones por VRSB, VPIB-3, VDVB, HVB-1 y VLVB pueden ser diagnosticadas mediante aislamiento viral, con pruebas serológicas que detectan al virus o sus componentes, anticuerpos, o con pruebas basadas en ácidos nucleicos que detectan el DNA genómico por PCR o RT-PCR, hibridación de ácidos nucleicos o secuenciación.

2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades virales DVB, RSB, HVB-1, PIB-3 y LVB afectan a la ganadería bovina a nivel mundial y posiblemente en México. Por lo cual, es necesario realizar el diagnóstico adecuado de éstos agentes infecciosos.

Los ensayos de diagnóstico empleados actualmente en México se pueden complementar con ensayos moleculares como es el caso de la PCR-TR y RT-PCR-TR, caracterizados por ser más rápidos, sensibles y específicos, además de ser cuantificables, y disminuir el riesgo de contaminación durante el procesamiento de las muestras.

Es por ello que se estandarizan la PCR TR y RT-PCR-TR, para identificar y cuantificar virus de interés en la producción bovina en México de una manera rápida y específica.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica PCR y RT-PCR tiempo real, para la identificación y cuantificación de los virus DVB, RSB, PIB3, HVB1 y LVB.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Propagar virus de referencia en cultivo celular: DVB (cepa NADL), RSB (cepa Iowa), PIB-3 (cepa SF-4), HVB1 (cepa Oregon) y LVB (línea celular persistentemente infectada LB 3.1), y obtener el título viral, mediante TCID₅₀%.
2. Estandarizar las técnicas PCR y RT-PCR convencional para amplificar las regiones blanco de interés de los virus DVB, RSB, PIB3, HVB1 y LVB para la obtención de cDNA.
3. Generar controles estándar de cuantificación para los virus DVB genotipo I y genotipo II, RSB, PIB3, HVB1 y LVB.
4. Estandarizar la técnica PCR tiempo real, para los virus DVB, RSV, PIB3, HVB1 y LVB.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Líneas celulares

Células MDBK ATCC CLL-22 (American Type Culture Collection). Esta línea celular es obtenida a partir de riñón de bovino y muestran susceptibilidad a la infección por los siguientes virus: virus de la estomatitis vesicular, parvovirus Bovino, adenovirus bovino tipo 2, adenovirus bovino tipo 3, virus de la diarrea viral bovina tipo así como virus de la parainfluenza bovina tipo 3. Frente al poliovirus 2 presenta resistencia.

Células VERO ATCC CCL-81 (American Type Culture Collection). Esta línea celular es obtenida a partir de riñón de mono verde africano adulto. Presenta susceptibilidad a diversos virus entre los que destacan adenovirus y paramixovirus entre ellos virus de parainfluenza tipo 2.

4.2. Virus

4.2.1. Propagación

Los virus RSB cepa Iowa, PIB-3 cepa 375 y HVB-1 cepa Colorado fueron propagados como se describe a continuación: las monocapas de células VERO semiconfluentes crecidas en botellas de 175 cm² se infectaron con el virus durante una hora a 37 °C para permitir la adsorción del virus. Después de este periodo de incubación se retiró el sobrenadante y se agregó medio de mantenimiento o de infección DMEM con suero fetal bovino al 2% y se incubaron a una temperatura de 37 °C por un periodo de 48 a 96 horas hasta que fuera visible el ECP. Una vez observado el ECP las células se desprendieron mecánicamente y fueron sonicadas por 10 minutos (marca del sonicador). Se centrifugaron por 10 minutos a 1500 rpm, los sobrenadantes se colectaron y se conservaron a -70 °C hasta su uso. Para el virus DVB cepa citopática NADL, se empleó la misma metodología sólo que para éste virus se

utilizaron células MDBK y el medio de mantenimiento o de infección contenía suero equino al 2%.

4.2.2. Titulación de los virus por TCID_{50%}/ml

La infectividad de los sobrenadantes de los cultivos de células VERO y células MDBK se determinó en monocapas de células semiconfluentes, crecidas en placas de 96 pozos con medio DMEM con SFB al 2% para las células VERO y SE al 2% para las células MDBK. Los pozos se infectaron con diluciones decuples seriadas de la suspensión viral iniciando 1:10 en medio DMEM con un volumen final de 200 µl. Hasta una dilución final 1×10^{-9} , incubándose por una hora para permitir la adsorción viral. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado. Las placas se incubaron hasta que se observó el ECP (48-96 horas). El título viral se expresó en TCID_{50%}/ml y se determinó utilizando la fórmula de Reed y Munch (Payment y Trudel, 1993).

4.3. PCR y RT-PCR punto final

4.3.1. Expresión de los genes N del VRSB, N del VPIB-3, 5'UTR del VDVB, gB del HVB-1 y pol del VLVB.

4.3.1.1. Extracción de ácidos nucleicos.

4.3.1.1.1. Extracción de RNA por Fenol-Ácido

Por cada 500 µl de muestra se agregó 1 mL DE RNA gt (BIOTECMOL) y se homogenizó vigorosamente; se adicionaron 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa en un tubo eppendorff de 1.5 ml y se adicionó 1 volumen de isopropanol absoluto frío, se homogenizó por inversión (7 veces) y se incubó a -20°C por una hora. Se centrifugaron a 12 000 rpm por 10 min a 4°C. Se

decantó el sobrenadante y se le agregó a la pastilla 500 µl de etanol al 75% con agua DEPC (dietil pirocarbonato) mezclando por inmersión (7 veces). Se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se secó la pastilla a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió la pastilla en agua DEPC (volumen aproximado de 25 µl) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

4.3.1.1.2. Extracción de DNA con la técnica de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico.

Se adicionó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) mezcló por 15 segundos y centrifugó a 10 000 rpm durante 8 minutos a temperatura ambiente. Se tomó el sobrenadante y transfirió a un tubo nuevo y agregó 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico, se mezcló por 15 segundos y centrifugó a 10 000 rpm por 8 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante y adicionaron 10 ng de glicógeno se mezcló y adicionó un volumen de isopropanol. Se centrifugó durante 10 min a 10 000rpm a 4°C, se decantó y lavó dos ocasiones con etanol al 70%. Posteriormente se secó la pastilla al vacío a 55°C. Finalmente se resuspendió la pastilla en agua estéril (volumen de 25 µl) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

4.3.1.2. RT-PCR para la amplificación del gen N del VRSB a partir de virus de referencia ATCC cepa Iowa.

Para amplificar las regiones de interés de los virus en estudio se emplearon las técnicas de Transcripción Reversa (RT) para la obtención de cDNA, y la PCR, con base en los protocolos establecidos en el Laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ-UNAM. Descritos a continuación.

Se amplificó un fragmento de 123 pb, de un segmento que codifica para el gen de la nucleoproteína, se reporta que éste gen es conservado entre los diferentes aislamientos reportados en el GenBank. Los iniciadores empleados en este trabajo fueron tomados de un estudio previo reportado por Boxus y

colaboradores en el año 2005. Los oligos BRSVfw y BRSVrw amplifican la región 2120 – 2243, dando lugar aún producto de amplificación de 123 pb y se sintetizaron en Bioserch Technologies (California, EUA). Las secuencias de los iniciadores son: BRSVfw GCA-ATG-CTG-CAG-GAC-TAG-GTA-TAAT (posición 2120-2144) y BRSVrw ACA-CTG-TAA-TTG-ATG-ACC-CCA-TTCT (posición 2219-2243).

4.3.1.3. RT-PCR para la amplificación del gen N del VPIB-3 a partir de virus de referencia ATCC 375.

Se amplificó un fragmento de 118 pb, de un segmento que codifica para el gen de la nucleoproteína, se reporta que éste gen es conservado entre los diferentes aislamientos reportados en el GenBank. Los iniciadores empleados en este trabajo fueron tomados de un estudio previo reportado por Zulauf en el año 2007. Los oligos PIB3fw y PIB3rw amplifican la región 507 - 625, dando lugar a un producto de amplificación de 118 pb y se sintetizaron en Bioserch Technologies (California, EUA). Las secuencias de los iniciadores son: PIB3fw GGG-AGT-GAT-CTT-GAG-TAT-GAT-CAA-GA (posición 507-532) y PIB3rw TGG-ATT-ATA-AGG-GCT-CCA-AGA-CA (posición 603-625).

4.3.1.4. RT-PCR para la amplificación de la región 5'UTR del VDVB genotipos I a partir de virus de referencia ATCC cepa NADL citopática y genotipo II a partir de vacuna comercial.

Se amplificó un fragmento de 167 pb, de un segmento que codifica para la región 5'UTR del VDVB genotipos I y II, se reporta que ésta región es conservada entre los diferentes aislamientos reportados en el GenBank. Los iniciadores empleados en este trabajo fueron tomados de un estudio previo reportado por Letellier y Kerkhofs en el año 2003. Los oligos DVbfw y DVbrw amplifican la región 224 - 391, dando lugar a un producto de amplificación de 167 pb y se sintetizaron en Bioserch Technologies (California, EUA). Las secuencias de los iniciadores son: DVbfw CTC-GAG-ATG-CCA-TGT-GGA-C (

posición 224-242) y DVBrw CTC-CAT-GTG-CCA-TGT-ACA-GCA (posición 371-391).

Las condiciones para la obtención del cDNA fueron:

5 µl de RNA, 0.5 µl de iniciador Fw (virus) (50µM), 9 µl de agua DEPC, esta mezcla se metió al termociclador a 70°C durante 5 minutos, y después a 4°C por 5 minutos. Posteriormente se agregaron 5 µl de Buffer (5x), 2.5 µl de dNTPs (Fermentas) (10mM), 1 µl de inhibidor de RNAsas (Fermentas) (4UI), 1 µl de enzima RT (Promega) (40U), y 0.5 µl de agua DEPC. Esta mezcla se metió al termociclador bajo las siguientes condiciones por un ciclo: 42°C, 60 min; 70°C, 10 min y se deja a 4°C.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se tomaron 5 µl de cDNA, 1µl de iniciadores Fw+Rw (virus) (0.5µM), 2 µl de enzima TaqPol (BIOTECMOL) (1U), dNTPs 0.4 µl (10mM), Buffer 2 µl (1x), MgCl₂ 1 µl (1.5 mM) y 8.8 µl de H₂O. Las condiciones de termociclador fueron: 94°C-5min, 94°C-30 seg, gradiente de 52, 54, 56 y 58°C-30 seg, por 30 ciclos, 72°C-90 seg, 72°C-15 min y finalmente se dejaron a 4°C.

4.3.1.5. PCR para la amplificación del gen de la glicoproteína B (gB) del VHB-1 a partir de cepa de referencia ATCC Oregon

Se amplificó un fragmento de 96 pb, de un segmento que codifica para el gen de la gB, se reporta que este gen se encuentra conservado entre los diferentes aislamientos reportados en el GenBank. Los iniciadores empleados en este trabajo fueron tomados de un estudio previo reportado por Wang y colaboradores en el año 2007. Los oligos VHB1fw y VHB1rw amplifican la región 57672 - 57768, dando lugar aun producto de amplificación de 96 pb y se sintetizaron en Bioserch Technologies (California, EUA). Las secuencias de los iniciadores son: VHB1fw : TGT-GGA-CCT-AAA-CCT-CAC-GGT (posición 57672-57692) y VHB1rw: GTA-GTC-GAG-CAG-ACC-CGT-GTC (posición 57748-57768).

4.3.1.6. PCR para la amplificación del gen *pol* del VLVB a partir de línea celular persistentemente infectada L 3.1

Se amplificó un fragmento de 113pb, de un segmento que codifica para el gen de la polimerasa viral (*pol*), se reporta que este gen se encuentra conservado entre los diferentes aislamientos reportados en el GenBank. Los iniciadores empleados en este trabajo fueron tomados de un estudio previo reportado por Heenemann y colaboradores en el año 2012. Los oligos VLVBfw y VLVBw amplifican la región 3093 - 3184, dando lugar a un producto de amplificación de 113 pb y se sintetizaron en Bioserch Technologies (California, EUA). Las secuencias de los iniciadores son: VLVBfw : CCCTGGCCTACTTTCAGACC (posición 3093–3112) y VLVBw : CTTGGCATAAGAGCTTAAGGCC (posición 3205–3184).

Las condiciones para la PCR fueron:

Para la reacción en cadena de la polimerasa se tomaron 5 µl de DNA, 1µl de iniciadores Fw+Rw (virus) (0.5uM), 2 µl de enzima TaqPol (BIOTECMOL) (1UI), dNTPs 0.4 µl (10mM), Buffer 2 µl (1x), MgCl₂ 1 µl (1.5 mM) y 8.8 µl de agua. Las condiciones de termociclador fueron: 94°C-5min, 94°C-30 seg, gradiente de 52, 54, 56 y 58°C-30 seg, por 30 ciclos, 72°C-90 seg, 72°C-15 min y finalmente se dejaron a 4°C.

La electroforesis de los productos de RT-PCR y PCR se llevó a cabo en geles de agarosa al 3% con TAE 1x, las condiciones de corrimiento electroforético fueron 84 Milivoltios (mV) constantes durante 90 minutos. Para visualizar los productos con un transiluminador de luz ultravioleta, los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio, y para determinar el tamaño de los productos se utilizó el marcador de peso molecular pBR322/Mspl.

4.4. Generación de controles estándares de cuantificación absoluta para RT-PCR y PCR tiempo real a partir de plásmidos recombinantes (recDNA)

Los productos de RT-PCR y PCR obtenidos y purificados previamente se utilizaron para la generación de controles estándares de cuantificación absoluta de RT-PCR y PCR tiempo real como se describe a continuación.

4.4.1. Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa con NaI y perlas de sílice.

Los productos de PCR a purificar se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3% y teñidos con bromuro de etidio. Con ayuda de un transiluminador se recortaron las bandas de interés y se colocaron en forma individual en tubos de 1.5 ml. Se pesaron los tubos con el fragmento (1g de gel=1ml), se adicionaron 3 volúmenes de yoduro de sodio 6M (molar) (JT Baker No. De catálogo 43748). Se incubaron los tubos 10 minutos a 55°C ó hasta que la agarosa se disolviera. Posteriormente se adicionaron 15µl de perlas de sílica e incubaron a 4°C por 60 minutos. Después se centrifugaron los tubos 4 min/12000rpm/4°C, y se descartó el sobrenadante. Se suspendieron las pastillas con 500 µl de solución de lavado 1x. Se centrifugaron nuevamente por 4min/12000rpm/4°C, descartó el sobrenadante repitiendo una vez más este proceso.

La pastilla obtenida se secó por calor en el concentrador 30 minutos a 45°C. Las pastillas fueron suspendidas en 30 µl de agua bidestilada estéril e incubadas a 55°C/ 5 min. Los tubos se centrifugaron a 12000rpm/4min a temperatura ambiente y recuperaron los sobrenadantes en tubos estéreles de 1.5 ml. Finalmente se tomaron 5 µl de cada purificación y se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta para verificar que realmente se había purificado el fragmento de PCR.

4.4.2. Clonación de productos de PCR purificados.

La clonación de los productos de PCR purificados de la región 5'UTR de VDVB I y II, gen de la nucleoproteína N de VRSB, gen de la nucleoproteína N del VPIB-3, gen de la glicoproteína B de VHB-1 y gen de la polimerasa pol del VLVB, se clonaron en el vector plasmídico pTZ57R/T (InsTAclone PCR Cloning Kit, Thermo Scientific, #K1213), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4.3. Ligación de productos de PCR en el vector plasmídico pTZ57R/T

Para la reacción de ligación se tomaron 5 µl (110ng) de DNA purificado por Nal, 2 µl del vector pTZ57R/T (InsTAclone PCR Cloning Kit, Thermo Scientific, #K1213), 2 µl de T4 DNA ligasa (Thermo Scientific # EL0014), 2 µl de buffer de ligación y 9 µl de agua, y se incubó la mezcla de ligación toda la noche a 4°C.

4.4.4. Transformación de bacterias competentes *Escherichia coli* DH5α y confirmación de clones recombinantes

Los productos de la ligación se utilizaron para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5α, las cuales se descongelaron en hielo y en un tubo de 1.5 ml estéril se agregaron 100 µl de células competentes y 8 µl de la reacción de ligación e incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se incubó en baño maría a 42°C por un minuto y enseguida se incubaron los tubos en hielo por 2 minutos. Se adicionó cbp 1 ml de caldo LB (Luria-Bertani) e incubaron a 37°C en agitación durante 60 minutos. Una vez transcurrido el periodo de incubación se retiraron los tubos e inmediatamente se colocaron en hielo, se tomaron 300 µl de las células transformadas y sembraron (pasando una espátula sobre toda la superficie) en cajas de agar LBampicilina X-gal IPTG e incubaron a 37°C por 24 horas aproximadamente.

Las cajas se sacaron de la incubación hasta que se observaron colonias bien definidas de color blanco. De la caja se seleccionaron 8 colonias y se

resembraron en una caja de agar LB con ampicilina previamente cuadrículada e identificada (un cuadrante por colonia), para esto se utilizaron puntas de 200µl. Cada vez que se sembraba una colonia se colocaban las puntas en tubos de PCR con 40µl de agua bidestilada. Se incubó la caja sembrada a 37°C por 24 horas y se suspendió el remanente de células que quedaron en las puntas y lisaron a 94°C por 10 minutos. Los lisados se utilizaron para realizar reacciones de PCR con los iniciadores específicos que amplifican para el gen de interés en estudio de cada uno de los virus y también con los iniciadores dirigidos al sitio múltiple de clonación del vector para confirmar la clonación.

Las condiciones para la PCR fueron:

Para la reacción en cadena de la polimerasa se tomaron 5 µl de DNA, 1µl de iniciadores específicos para cada uno de los virus, así como iniciadores específicos dirigidos al sitio múltiple de clonación del vector, 2 µl de enzima TaqPol (BIOTECMOL), dNTPs 2 µl (Thermo Scientific # R0192), Buffer 2 µl, MgCl₂ 1 µl y 8.8 µl de H₂O. Las condiciones de termociclador fueron: 94°C-5min, 94°C-30 seg, 56°C (VPIB-3, VRSB, VLVB) y 58°C (VDVB, VHB-1 y M13) -30 seg, por 30 ciclos, 72°C-90 seg, 72°C-5 min y finalmente se dejaron a 4°C.

4.4.5. Confirmación de clonas recombinantes por secuenciación

Una vez amplificado correctamente el gen en estudio, se purificó pasando el producto por un tubo que contenía perlas de sílica donde el DNA queda atrapado y los demás reactivos se eliminan por varios lavados. Posteriormente se realizó una variante de la PCR generalmente llamada PCR de secuencia. Al terminar la PCR de secuencia era necesario eliminar los restos de reactivos para que no interfirieran con la posterior lectura del secuenciador. Para ello las muestras se pasaron por columnas con shephadex G50 (#G50150, SIGMA) previamente equilibradas, se centrifugaron durante 4 minutos a 2700 rpm, una vez centrifugadas se secaron en una vacufuga aproximadamente 40 minutos a temperatura y velocidad máxima. Finalmente se enviaron a la unidad de secuenciación del Instituto de Biomédicas de la UNAM.

Las condiciones para la PCR de secuencia fueron las siguientes:

Una vez cuantificadas las muestras se calculó el volumen necesario de muestra para colocar la cantidad necesaria de DNA por muestra en la reacción de secuenciación, para las clonas recombinantes obtenidas la cantidad de DNA considerada fue de 1 a 3 ng, ya que el origen de la muestra era producto de PCR de 100-400 pb.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para cada tubo de muestra en forma separada, adicionando: 4µl de Ready Reaction Premix, 2µl de Big Dye Sequencing Buffer, iniciador 3.2 pmol, 3 ng de DNA y agua cbp 20 µl de volumen final. Las condiciones del termociclador fueron: 25 ciclos a 96°C, 10 segundos (desnaturalización); 50°C, 5 segundos (hibridación) y 60°C , 4 minutos (extensión), y finalmente se dejaron a 4°C. El protocolo está optimizado para el termociclador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) y el kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0. (#4390229). Una vez obtenidas las lecturas de secuenciación se editaron con el programa ChromasPro (Versió) y se sometieron a un alineamiento local con la plataforma BLAST del software CloneManager versión 9 para confirmar su homología con cepas reportadas en GenBank.

4.4.6. Conservación de clonas recombinantes

Las clonas que fueron confirmadas positivas mediante PCR convencional y secuenciación se crecieron en 10 ml de caldo LB ampicilina a 37°C en agitación durante 24 horas y posteriormente se congelaron. Para congelarlas se tomaron tubos de 1.5 ml estériles y se les agregó 1ml del cultivo crecido y centrifugaron a 3 500 rpm durante 8 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron con 1ml de medio para congelación LBampicilina glicerol una vez realizado este procedimiento se congelaron inmediatamente a -70 °C. El resto del cultivo se tomó para crecerlo partiendo de una dilución 1:500 en un

volumen de 250 ml de medio LB ampicilina para la obtención de recDNA a gran escala.

4.4.7. Obtención de recDNA a gran escala (Maxiprep)

Para la obtención de recDNA de las clonas recombinantes seleccionadas se crecieron en 250 ml medio LB ampicilina a 37°C durante 24 horas en agitación constante. Transcurrido el periodo de incubación se procedió a realizar la obtención del recDNA con el kit Zyppy™ Plasmid Maxiprep (Zymo Reserch, #D4027) acorde a las especificaciones del fabricante.

Se centrifugó el cultivo bacteriano a 3, 400 gravedades por 10 minutos se descartó el sobrenadante y se agregaron 15 ml del buffer P1 (#D4027-1-160) a la pastilla de bacterias y fueron resuspendidas mediante pipeteo. Se agregaron 15 ml del buffer P2 (#D4027-2-160) y mezclo por inversión (4-6 veces) y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente para favorecer la lisis bacteriana. Se agregaron 20 ml de buffer P3 (D4027-3-220) y mezcló suavemente e incubó en hielo por 5 minutos para neutralizar la reacción y permitir que las células lisadas precipitaran. Se transfirió la mezcla a tubos cónicos de 50 ml y centrifugó a 3,400 gravedades por 10 minutos para que se formará una pastilla con los restos celulares. Transcurrido este tiempo se agregaron 10 ml del sobrenadante a las columnas Zymo-Spin™ VI (#C1013-10), previo ensamble en un tubo cónico nuevo de 50 ml, y se centrifugó a 3,400g por dos minutos, se descartó el líquido obtenido y se repitió este paso hasta que todo el sobrenadante obtenido anteriormente fuera pasado a través de la columna para que se filtrara. Posteriormente se lavó la columna agregando 10 ml de Endo-Wash Buffer (#D4036-3-120) a la columna y centrifugada a 3,400g por 30 segundos, se descartó el flujo obtenido. Se agregaron 10 ml de Zyppy™ Wash buffer (#D4036-4-24) a la columna y centrifugó a 3,400g por un minuto, se descartó el flujo obtenido. Para eluir la muestra, se transfirió la columna a un tubo cónico de 50 ml nuevo y se agregaron 3 ml de Zyppy™ Elution Buffer (#D4036-4-24) a la columna

incubada durante un minuto a temperatura ambiente, después centrifugada a 3,400g por un minuto. Finalmente el recDNA se congeló a -20°C hasta su uso. La pureza del DNA se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro (EPOCH).

4.5. Estandarización de PCR y RT-PCR tiempo real

Para estandarizar la RT PCR y PCR tiempo real para los virus en estudio se utilizaron iniciadores y sondas reportados en estudios previos (Tabla 1), cada uno de los iniciadores y sondas se reporta que codifican para regiones altamente conservadas. Los genes utilizados son: VDVBI y VDVBII región 5'UTR; VRSB gen de la nucleoproteína (N); VPIB-3 gen de la nucleoproteína (N); VHB-1 gen de la glicoproteína B (gB); VLVB gen de la polimerasa viral (pol). Como housekeeping o gen constitutivo de expresión se empleó Beta actina bovina, el cual sirvió para validar procesos de extracción de ácidos nucleicos y validar que no se presentaban inhibidores al momento de llevar a cabo las reacciones de RT PCR y PCR tiempo real. El empleo de dos sondas en el caso del VDVB permitió cuantificar y genotipificar al mismo tiempo de realizar la reacción de RT-PCR tiempo real en el mismo tubo.

TABLA 1. INICIADORES Y SONDAS EMPLEADOS PARA PCR y RT-PCR TIEMPO REAL.

INICIADOR	SECUENCIA	pb
VRSBFw ¹	5'-GCAATGCTGCAGGACTAGGTATAAT-3'	123
VRSBRw ¹	5'-ACACTGTAATTGATGACCCCATCT-3	
VRSBprobe ¹	5'-CAL Fluor Orange 560-ACCAAGACTTGTATGATGCTGCCAAAGCA-BHQ-1-3'	
VPIB-3Fw ⁵	GGGAGTGATCTTGAGTATGATCAAGA	113
VPIB-3Rw ⁵	TGG-ATTATAAGGGCTCCAAGACA	
VPIB-3probe ⁵	5'ROX- ACTTCTACAATCGAGGATCTTGTTTCATACTTTTGG-	

	3'BHQ-3	
VHB-1Fw ²	TGTGGACCTAAACCTCACGGT	96
VHB-1Rw ²	GTAGTCGAGCAGACCCGTGTC	
VHB-1probe ²	5' CAL Fluor Red 610-AGGACCGCGAGTTCTTGCCGC-BHQ-1-3'	
VDVBFw ³	5'-CTCGAGATGCCATGTGGAC-3'	167
VDVBRw ³	5'-CTCCATGTGCCATGTACAGCA-3'	
VDVBprobe I ³	5'-CAL Fluor Orange 560 CAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGC-BHQ-1 3'	
VDVBprobell ³	5' CAL Fluor Red 610 CACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAGACCTG-BHQ-1 3'	
VLVBFw ⁶	CCCTGGCCTACTTTCAGACC	123
VLVBRw ⁶	CTTGGCATAAGAGCTTAAGGCC	
VLVBprobe ⁶	TTGACTGACAACCAAGCCTCACCT	
ACT2-1030-F ⁴	5'AGCGCAAGTACTCCGTGTG3'	
ACT-1135-R ⁴	5'CGGACTCATCGTACTCCTGCTT 3'	
ACTprobe ⁴	FAM-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-BHQ1	

1. Boxus M., Letellier C., Kerkhofs P. 2005. *Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus*. Journal of Virological Methods; 125: 125-130. Virology Department, Veterinary and Agrochemical Research Center, 1180 Uccle, Belgium
2. Wang J., O'Keffe J., Orr D., Loth L., Banks M., Wakeley P., West D., Card R., Iyata G., Van Maanen K., Thoren P., Isaksson . y Kerkhofs P. 2007. *Validation of a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen*. Journal of Virological Methods; 144: 103-108.
3. Letellier C. y Kerkhofs P. 2003. *Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus*. 144: 21-27.
4. Wernike .2011. *Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type*
5. Brian J. Zulauf. 2007. *Multiplex Real-Time PCR in the Detection and Differentiation of Bovine Respiratory Disease Pathogens*. Tesis de Maestria. Universidad de Oregon, Estados Unidos de América.

6. Heenemann K., Lapp S., Tifke JP., Fitchner D., Mettenleiter TC., and Vahlenkamp TW. 2012. Development of a Bovine leukemia virus polymerase gene-based real-time polymerase chain reaction and comparison with an envelope gene -based assay. J VET Diagn Invest 2012 24: 649 originally published online 23 May 2012

Para confirmar que realmente reconocían las secuencias de los genes virales en estudio se alinearon las secuencias de los iniciadores y las sondas con secuencias de virus que se encontraban reportados en el GenBank utilizando el software ClonManager versión 9.

La preparación de las reacciones se llevó a cabo siguiendo la metodología empleada en el Laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ-UNAM.

Las condiciones de RT-PCR y PCR tiempo real fueron las siguientes en un volumen final de 20 µl: 1.2 µl de agua, Buffer TaqPolimerasa 2µl (1x), dNTPs 2 µl (0.2mM), MgCl₂ 2 µl (3.5mM), Iniciadores (virus) Fw+Rw 1 µl (0.5 µM), Sonda (virus) 0.2 µl (0.1 µM), Iniciadores control interno Fw+Rw 1 µl (0.5 µM), Sonda control interno 0.2 µl (0.1 µM), enzima TaqPol 0.2 µl (1UI), enzima Reverso Transcriptasa 0.2 µl (40UI), inhibidor de RNAsas 0.1 µl (4U) y DNA/RNA 10 µl. Las condiciones del termociclador fueron: 42°C por 30 minutos; 95°C por 10 minutos; 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 45 segundos. Para que el termociclador captara la fluorescencia emitida por las sondas se activaron los canales de captación amarillo, naranja, rojo y verde.

4.5.1. Especificidad de la PCR y RT-PCR tiempo real

Para verificar la especificidad de los ensayos se realizó extracción de RNA y DNA de virus de referencia ATCC sometidos a RT-PCR y PCR tiempo real para mostrar que no existía reacción cruzada con otros virus.

4.5.2. Sensibilidad de la PCR y RT-PCR tiempo real

Para establecer el límite de detección de los ensayos se realizaron diluciones seriadas con log 10 del recDNA (10^{-1} hasta 10^{-8}) y se amplificaron mediante PCR tiempo real. Midiendo los valores de Ct por triplicado y graficados contra el logaritmo de la cantidad inicial del número de copias de recDNA. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando un volumen de reacción de 20 μ l. Para una reacción el ensayo se optimizó a un volumen de 10 μ l de la mezcla de PCR y 10 μ l de DNA o RNA.

4.5.3. Repetibilidad de la PCR y RT-PCR tiempo real

La repetibilidad de los ensayos se examinó mediante la corrida de curvas estándar para cada uno de los virus durante tres días. Obteniendo coeficientes de variación de los valores de Ct para los controles de estándares de cuantificación absoluta.

5. RESULTADOS

5.1. Propagación de los virus.

La presencia de virus en cada cultivo celular infectado se confirmó por titulación del virus infeccioso en los sobrenadantes por TCID₅₀/ml en células VERO para los virus RSB (cepa Iowa), PIB-3 (cepa 375), VHB-1 (cepa Oregon), y para el VDVB (cepa citopática NADL) en células MDBK.

El título del VRSB extracelular (producido en 96 horas) fue de $1 \times 10^{5.2}$ TCID₅₀/ml. Para el VPIB-3 el título extracelular (producido en 72 horas) fue de $1 \times 10^{6.3}$ TCID₅₀/ml. El título extracelular del VHB-1 (producido en 72 horas) fue de $1 \times 10^{5.8}$ TCID₅₀/ml. Para el VDVB el título extracelular obtenido fue $1 \times 10^{6.2}$ TCID₅₀/ml.

El objetivo de titular los virus mediante ésta técnica fue comparar la linealidad de la RT-PCR y PCR tiempo real con el empleo de un método virológico convencional, además de tener la capacidad de realizar una equivalencia del número de copias obtenidas mediante RT-PCR y PCR tiempo real en número de partículas virales infecciosas.

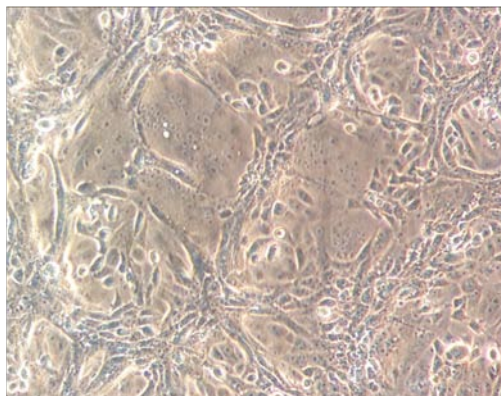


Figura 1. Monoestrato de células VERO infectadas con VRSB cepa Iowa. Efecto citopático característico por la formación de sinsitios.

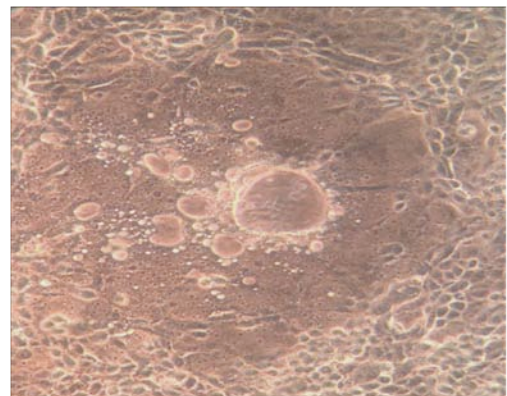


Figura 2. Monoestrato de células VERO infectadas con VPIB-3 cepa 375. Efecto citopático: formación de sinsitios.

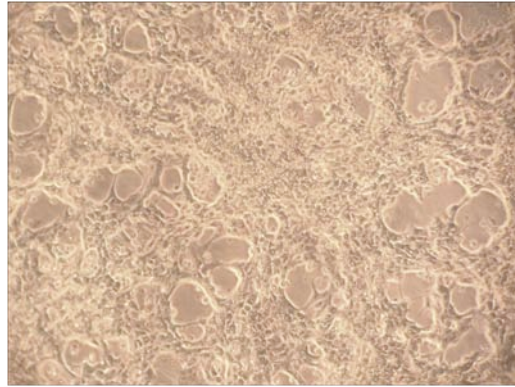


Figura 3. Monoestrato de células VERO infectadas con VHB-1 cepa Óregon. Efecto citopático característico por zonas de lisis, muerte celular y redondeamiento de células.

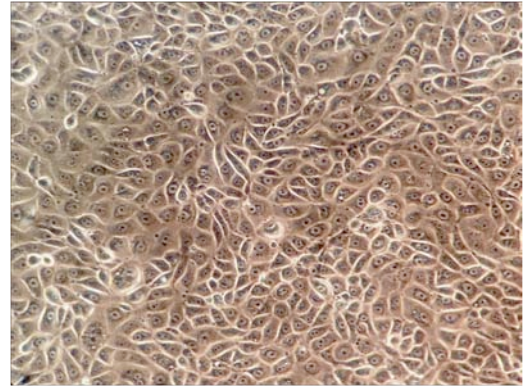


Figura 4. Monoestrato de células VERO sin infectar.

5.2. PCR y RT-PCR punto final

5.2.1. Expresión de los genes *N* del VRSB, *N* del VPIB-3, región 5'UTR del VDVB I y II, *gB* del VHB-1, *pol* del VLVB.

Con la finalidad de verificar la expresión y presencia del genoma viral se hizo RT-PCR en dos pasos para determinar la expresión del gen *N* del VRSB. El resultado obtenido por RT-PCR mostró una banda de 123 pb correspondiente al segmento amplificado del gen *N*, con una temperatura de alineamiento para los iniciadores de 56°C. Para el VPIB-3, el resultado obtenido mostró una banda de 123 pb correspondiente al segmento amplificado del gen *N*, con una temperatura de alineamiento de 56°C. Por otra parte para el VDVB I y II el resultado obtenido fue un fragmento de 167 pb correspondiente a la región 5'UTR con una temperatura de alineamiento para los iniciadores de 58°C.

En lo que corresponde a los virus DNA, para el VHB-1 la PCR mostró una banda de 96 pb, correspondiente al gen de la *gB* y con una temperatura de alineamiento de 58°C. Para el caso del VLVB el resultado de la PCR mostró una banda de 113 pb, correspondiente al gen *pol*, con una temperatura de alineamiento de los iniciadores de 56°C. Los productos amplificados de RT-

PCR y PCR fueron purificados para ser clonados posteriormente y generar controles estándares de cuantificación absoluta.

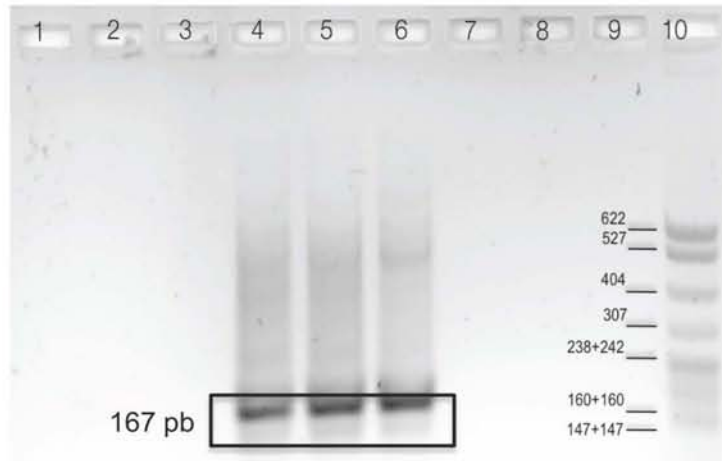


Figura 5. Gel de agarosa al 3% para muestras de PCR, teñido con bromuro de etidio para visualizar el producto de amplificación de los iniciadores dirigidos al gen de la región conservada 5'UTR de VDV B, con un producto esperado de 167 pares de bases el cual se puede observar en los carriles 4, 5 y 6. En el carril 10 se observa el Marcado de Peso Molecular pBR 322/Mspl.

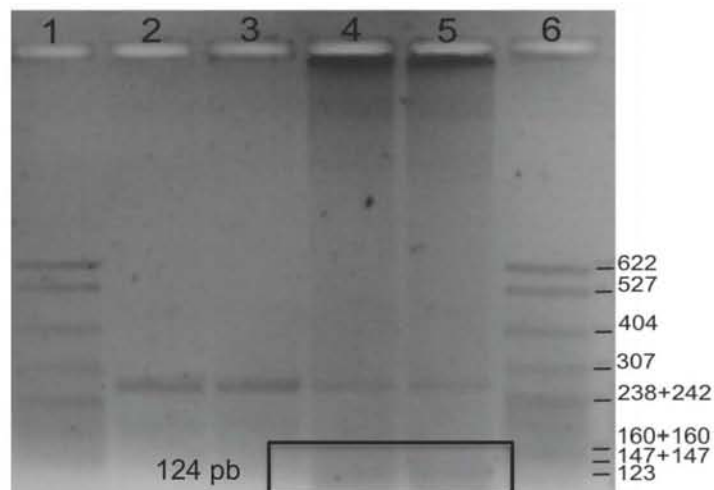


Figura 6. Gel de agarosa al 3% para muestras de PCR, teñido con bromuro de etidio para visualizar el producto de amplificación de los iniciadores dirigidos al gen de la nucleoproteína de VRSB, con un producto esperado de 124 pares de bases el cual se puede observar en los carriles 4 y 5. En los carriles 1 y 6 se observa el Marcado de Peso Molecular pBR 322/Mspl.

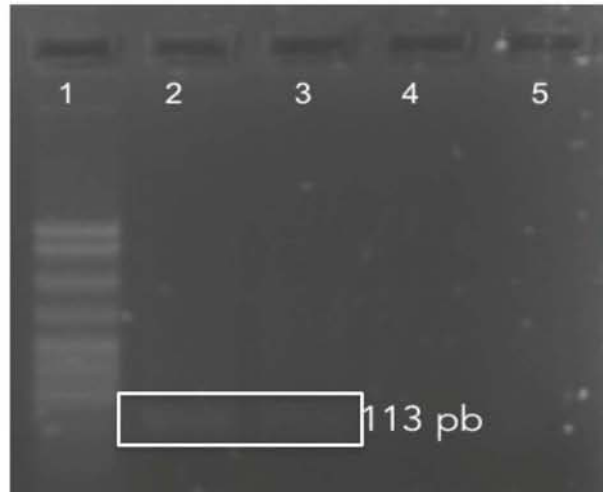


Figura 7. Gel de agarosa al 3% para muestras de PCR, teñido con bromuro de etidio para visualizar el producto de amplificación de los iniciadores dirigidos al gen de la nucleoproteína de VPIB-3, con un producto esperado de 113 pares de bases el cual se puede observar en los carriles 2 y 3. En el carril 1 se observa el Marcado de Peso Molecular pBR 322/Mspl.

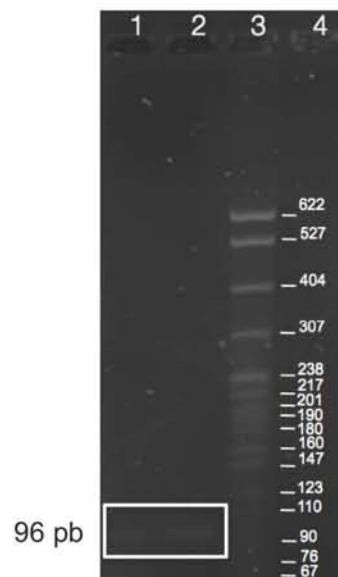


Figura 8. Gel de agarosa al 3% para muestras de PCR, teñido con bromuro de etidio para visualizar el producto de amplificación de los iniciadores dirigidos al gen de la glicoproteína B (gB) de HVB1, con un producto esperado de 96 pares de bases el cual se puede observar en los carriles 1 y 2. En el carril 3 se observa el Marcador de Peso Molecular pBR 322/Mspl. Carril 4 control negativo.



Figura 9. Gel de agarosa al 3% para muestras de PCR, teñido con bromuro de etidio para visualizar el producto de amplificación de los iniciadores dirigidos al gen *pol* de VLVB, con un producto esperado de 113 pares de bases. Se colocaron de la clona 1-12, en los carriles 2-12. Carril1, Marcador de peso molecular pBR 322/Mspl.

5.3. Generación de controles estándares de cuantificación absoluta para PCR y RT-PCR tiempo real a partir de plásmidos recombinantes (recDNA)

Para generar éstos controles estándares de cuantificación absoluta empleados en RT-PCR y PCR tiempo real se clonaron los productos amplificados mediante RT-PCR y PCR convencional, y purificados mediante Nal y perlas de sílice, en un vector T comercial. Una vez ligado el producto al vector pTZ57R/T se transformaron células competentes DH5 α y plaqueadas en cajas de agar LBampicilina X-gal IPTG e incubadas, transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron clonas recombinantes con base en su morfología las cuales deberían ser colonias bien definidas, aisladas y de color blanco o crema. Se picaron y sembraron en placa de agar LBampicilina, las mismas clonas se lisaron y se sometieron a reacción de PCR con iniciadores específicos dirigidos a cada uno de los virus estudiados y así confirmar la inserción del producto de amplificación (Fig. 10). Aquellas que dieron una reacción positiva se crioconservaron mediante congelación y se crecieron en medio líquido LB ampicilina para la obtención de recDNA a gran escala (maxiprep) y se mandaron secuenciar para su confirmación final.

Los controles obtenidos a partir de las cepas virales de referencia fueron los listados en el cuadro 2.

VIRUS	Nombre del plásmido	Longitud en nucleótidos	No. de moléculas/μl
VRSB	pVRSB7	2886	3.16E+08
VPIB-3	pPIB3	2999	3.04E+08
VDVB I	pDVBI9	3053	2.99E+08
VDVB II	pDVBI19	3053	2.99E+08
VHB-1	pHVB1-17	2980	3.06E+08
VLVB	pLVB9	2999	3.04E+08

Cuadro 2. Controles de cuantificación estándar construidos mediante clonación a partir de los virus de referencia en estudio.

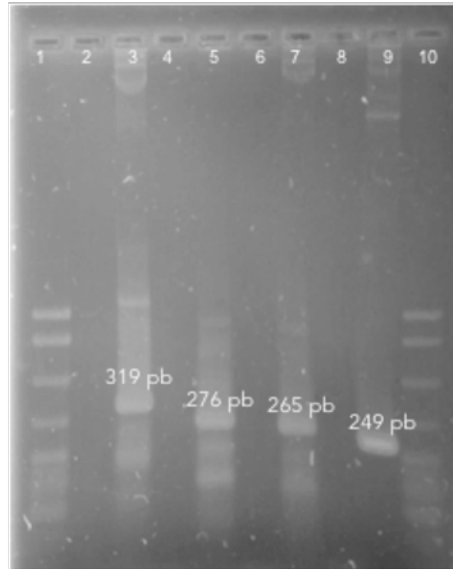


Figura 10. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio para visualizar productos de PCR. Productos de amplificación de los iniciadores dirigidos hacia el sitio múltiple de clonación del vector T con el inserto de VDVB I de 319 pb (carril 3); de VRSB de 276 pb (carril 5); de LVB de 265 pb (carril 7) y con el inserto de HVB1 un tamaño esperado de 249 pb (carril 9). Marcador de peso molecular pBR 322/Mspl, carriles 1 y 10. Carriles 2, 4, 6 y 8 vacíos.

Las secuencias obtenidas a partir de los recDNA se analizaron con el software CloneManager versión 9. A continuación se muestran las secuencias obtenidas y alineadas con secuencias reportadas en GenBank, en las cuales se observa que a nivel de nucleótidos se alinean de manera adecuada, teniendo la capacidad de reconocer una diversas secuencias reportadas en las base de datos.

JQ799141	81	gagtagcagggtagtcgctcagtggttcgacactc--gaaataacgagtagtcgaggtgccacgtggacgagggcatgcccatagacacatctt
KC695810	72	gagtagcagggtagtcgctcagtggttcgacgccc-----gagtagtcgagatgccacgtggacgagggcatgcccacagcacatctt
AF526381	123	gagtagcagggtagtcgctcagtggttcgacgccc-----gagtagtcgagatgccacgtggacgagggcatgcccacagcacatctt
KC853441	178	gagtagcagggtagtcgctcagtggttcgacacccatggaacgttag--gctcagagatgccacgtggacgagggcatgcccacagcacatctt
KC853440	178	gagtagcagggtagtcgctcagtggttcgacacccatggaacgttag--gctcagagatgccacgtggacgagggcatgcccacagcacatctt
KC695814	155	gagtagcagggtagtcgctcagtggttcgacgctt--tctgagcaca--gctcagagatgccacgtggacgagggcatgcccacagcacatctt
AF220247	177	gagtagcagggtagtcgctcagtggttcgacgctt--tggaggacaa--gctcagagatgccacgtggacgagggcatgcccacagcacatctt
KC963967	174	gagtagcagggtagtcgctcagtggttcgacgctt--tggaggacaa--gctcagagatgccacgtggacgagggcatgcccacagcacatctt
DQ888995	168	gagtagcagggtagtcgctcagtggttcgacgctt--tggaaataaag--gctcagagatgccacgtggacgagggcatgcccacagcacatctt
NC_001461	179	gagtagcagggtagtcgctcagtggttcgacgctt--tggaaataaag--gctcagagatgccacgtggacgagggcatgcccacagcacatctt
BVDCG	179	gagtagcagggtagtcgctcagtggttcgacgctt--tggaaataaag--gctcagagatgccacgtggacgagggcatgcccacagcacatctt
pDVBI9	167	-----tctcagagatgccatgtggacgagggcatgcccacagcacatctt
JQ799141	169	agccttagtgggggtcgcccaggcaaatgctcttcccttagagga--gttgcgaagcagagcctgataggggtgctgcagagggcccactgat
KC695810	160	aatctggggcggggtcgctcagacgaaaagcggtt---gtttc--aacggttgcgaatcacagcctgataggggtgctgcagagggcccactgat
AF526381	212	atctcgggacgaggggtcgcccgggaaagaaagcggtt---gta--ctaacgcttatggacagggcctgatagggatgctgcagagggcccactgat
KC853441	267	aaacttggcaggggtcgcccaggtaaaagtggcc---t--aaccaaccactacgaacacagcctgataggggtgctgcagagggcccactgtc
KC853440	267	aaacttggcaggggtcgcccaggtaaaagtggcc---t--aaccaaccactacgaacacagcctgataggggtgctgcagagggcccactgtc
KC695814	243	aaacttagcgggggtcgctcagtgtaaaacggtt---t--aaccaaccgctacgaatcacagcctgataggggtgctgcagagggcccactgta
AF220247	265	aaacttagcgggggtcgctcagtgtaaaacggtt---t--aaccaaccgctacgaatcacagcctgataggggtgctgcagagggcccactgta
KC963967	262	aaacttagcgggggtcgctcagtgtaaaacggtt---t--aaccaaccgctacgaatcacagcctgataggggtgctgcagagggcccactgta
DQ888995	256	aaacttagcgggggtcgcccaggtaaaagcagtt---t--aacccgactgttacggaatcacagcctgataggggtgctgcagagggcccactgta
NC_001461	267	aaacttagcgggggtcgcccaggtaaaagcagtt---t--aacccgactgttacggaatcacagcctgataggggtgctgcagagggcccactgta
BVDCG	267	aaacttagcgggggtcgcccaggtaaaagcagtt---t--aacccgactgttacggaatcacagcctgataggggtgctgcagagggcccactgta
pDVBI9	123	aaacttagcgggggtcgcccaggtaaaagcagtt---t--aacccgactgttacggaatcacagcctgataggggtgctgcagagggcccactgta
JQ799141	257	ttgctagtataaaatctctgctgtacatggcacatggagttgataaactaatgaacttttatacaaaaacttacaacaaaaaacctagtggag
KC695810	246	ttgctactataaaatctctgctgtacatggcacatggagttgatttcaaatgaacttttatacaaaaacttacaacaaaaaacctagcaggag
AF526381	298	ttgctactataaaatctctgctgtacatggcacatggagttgatttcaaatgaacttttatacaaaaacttacaacaaaaaaccttagggag
KC853441	353	ttgctactataaaatctctgctgtacatggcacatggagttgatacaaaaacttatacaaaaacttacaacaaaaaaccttagggag
KC853440	353	ttgctactataaaatctctgctgtacatggcacatggagttgatacaaaaacttatacaaaaacttacaacaaaaaaccttagggag
KC695814	329	ttgctactataaaatctctgctgtacatggcactggagttgatacaaaaacttatacaaaaacttacaacaaaaaaccttagggag
AF220247	351	ttgctactataaaatctctgctgtacatggcactggagttgatacaaaaacttatacaaaaacttacaacaaaaaaccttagggag
KC963967	348	ttgctactataaaatctctgctgtacatggcactggagttgatacaaaaacttatacaaaaacttacaacaaaaaaccttagggag
DQ888995	343	ttgctactataaaatctctgctgtacatggcactggagttgatacaaaaacttatacaaaaacttacaacaaaaaaccttagggag
NC_001461	354	ttgctactataaaatctctgctgtacatggcactggagttgatacaaaaacttatacaaaaacttacaacaaaaaaccttagggag
BVDCG	354	ttgctactataaaatctctgctgtacatggcactggagttgatacaaaaacttatacaaaaacttacaacaaaaaaccttagggag
pDVBI9	36	ttgctactataaaatctctgctgtacatggcactggagttgatacaaaaacttatacaaaaacttacaacaaaaaaccttagggag

Figura 11. Alineamiento de la construcción pDVBI9 con secuencias reportadas en GenBank del VDVB genotipo I.

AB567658	457	caggttcaatgacacccctgctgggtttttggtttatagtgtttgtataaaaagtccatttgaactcaactccatgtgccatgtacagcagagtt
JF714967	455	caggttcccaaacctcctgctgggtttttggtttatagtgtttgtataaaaagtccatttgaaaaacaactccatgtgccatgtacagcagagtt
HQ258810	455	caggttcccaaacacccctgctgggtttttggtttatagtgtttgtataaaaagtccatttgaaaaacaactccatgtgccatgtacagcagagtt
FJ527854	455	caggttcccaaacacccctgctgggtttttggtttatagtgtttgtataaaaagtccatttgaaaaacaactccatgtgccatgtacagcagagtt
AF502399.1	455	caggttcccaacagcctcctgctgggtttttggtttatagtgtttgtataaaaagtccatttgaaaaacaactccatgtgccatgtacagcagagtt
AF502399	455	caggttcccaacagcctcctgctgggtttttggtttatagtgtttgtataaaaagtccatttgaaaaacaactccatgtgccatgtacagcagagtt
KC963968	456	caggttcccaacagcctcctgctgggtttttggtttatagtgtttgtataaaaagtccatttgaaaaacaactccatgtgccatgtacagcagagtt
NC_002032	425	caggttcccaacagcctcctgctgggtttttggtttatagtgtttgtataaaaagtccatttgaaaaacaactccatgtgccatgtacagcagagtt
GQ888686	457	caggttcccaaacacccctcctggtttttggtttatagtgtttgtataaaaagtccatttgaaaaacaactccatgtgccatgtacagcagagtt
pDVBI9	169	-----ctccatgtgccatgtacagcagagtt
AB567658	367	ttt--actagcggagtagcaggtctctgctacacccctatcaggtctgttccataaacaccacaaaatggtgctttcacctacgcaaccccc
JF714967	365	ttt--actagcagaaatagcaggtctctgctacacccctatcaggtctgttccataaacaccctag--aatgggtgctttcacccatgcaaccccc
HQ258810	365	ttt--actagcggaaatagcaggtctctgctacacccctatcaggtctgttccataaacaccacg--aatgggccttttcacctatgcaaccccc
FJ527854	365	ttt--actagcggaaatagcaggtctctgctacacccctatcaggtctgttccataaacaccacg--aatgggccttttcacctatgcaaccccc
AF502399.1	365	ttt--actagcggaaatagcaggtctctgctacacccctatcaggtctgttccataaacaccacg--aatgggccttttcacctatgcaaccccc
AF502399	365	ttt--actagcggaaatagcaggtctctgctacacccctatcaggtctgttccataaacaccacg--aatgggccttttcacctatgcaaccccc
KC963968	366	ttt--actagcggagtagcaggtctctgctacacccctatcaggtctgttccataaacaccacg--aatgggccttttcacctatgcaaccccc
NC_002032	335	ttt--actagcggaaatagcaggtctctgctacacccctatcaggtctgttccataaacaccacg--aatgggccttttcacctatgcaaccccc
GQ888686	367	tttactagcgggtagcaggtctctgctacacccctatcaggtctgttccataaacaccacg--aatgggccttttcacctatgcaaccccc
pDVBI9	143	tttactagcgggtagcaggtctctgctacacccctatcaggtctgttccataaacaccacg--aatgggccttttcacctatgcaaccccc
AB567658	278	cataggttaaggtgtgccgtgggcatgccctcgtccacatggcatctcgagactcctgcaatgcttagagcgtgcaaccattgacgactcc
JF714967	277	catgggttaagatgtgccgtgggcaagccctcgtccacatggcatctcgagactcctcgactgacggaggtgcaaccattgacgactcc
HQ258810	277	cataggttaagatgtgccgtgggcatgccctcgtccacatggcatctcgagactcctcgactgacggaggtgcaaccattgacgactcc
FJ527854	277	cataggttaagatgtgccgtgggcatgccctcgtccacatggcatctcgagactcctcgactgacggaggtgcaaccattgacgactcc
AF502399.1	277	catgggttaagatgtgccgtgggcatgccctcgtccacatggcatctcgagactcctcgactgacggaggtgcaaccattgacgactcc
AF502399	277	catgggttaagatgtgccgtgggcatgccctcgtccacatggcatctcgagactcctcgactgacggaggtgcaaccattgacgactcc
KC963968	278	catgggttaagatgtgccgtgggcatgccctcgtccacatggcatctcgagactcctcgactgacggaggtgcaaccattgacgactcc
NC_002032	247	ctgggttaagatgtgccgtgggcatgccctcgtccacatggcatctcgagactcctcgactgacggaggtgcaaccattgacgactcc
GQ888686	278	catgggttaagatgtgccgtgggcatgccctcgtccacatggcatctcgagactccttaactgaggaggtgcaaccattgacgactcc
pDVBI9	54	cataggttaagatgtgccgtgggcatgccctcgtccacatggcatctcgagactcctcgagactcctcgagactcctcgagactcctcgagactcct

Figura 12. Alineamiento de la construcción pDVBI19 con secuencias reportadas en GenBank del VDVB genotipo II.

```

pVR5B7          123 -----tacctgtaattgatgaccccatctcttttagttgttctgcatatgctttggcagcatcatac
AF295543       2270 tctaattcctctgtagtcagatccaataacactgtaattgatgaccccatctcttttagttgttctgcatatgctttggcagcatcatac
AF092942       2270 tctaattcctctgtagtcagatccaataacactgtaattgatgaccccatctcttttagttgttctgcatatgctttggcagcatcatac
S40504         1142 tctaattcctctgtagtcagatccaataacactgtaattgatgaccccatctcttttagttgttctgcatatgctttggcagcatcatac
BR5NUCLP       1127 tctaattcctctgtagtcagatccaataacactgtaattgatgaccccatctcttttagttgttctgcatatgctttggcagcatcatac
AF054666       2249 tctaattcctctgtagtcagatccaataacactgtaattgatgaccccatctcttttagttgttctgcatatgctttggcagcatcatac
AF054667       2249 tctaattcctctgtagtcagatccaataacactgtaattgatgaccccatctcttttagttgttctgcatatgctttggcagcatcatac
AF054668       2249 tctaattcctctgtagtcagatccaataacactgtaattgatgaccccatctcttttagttgttctgcatatgctttggcagcatcatac
AF054665       2249 tctaattcctctgtagtcagatccaataacactgtaattgatgaccccatctcttttagttgttctgcatatgctttggcagcatcatac
AF295544       2226 tctagtctctctgtagtcagatccaataacactgtaattgatgaccccatctcttttagttgttctgcatatgctttggcagcatcatac
BR5MNP         1142 tctagtctctctgtagtcagatccaataacactgtaattgatgaccccatctcttttagttgttctgcatatgctttggcagcatcatac

pVR5B7          59 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcat-----
AF295543       2180 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcatgacctaggactacactagagaatttggggaat
AF092942       2180 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcatgacctaggactacactagagaatttggggaat
S40504         1052 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcatgacctaggactacactagagaagtggggaat
BR5NUCLP       1037 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcatgacctaggactacactagagaagtggggaat
AF054666       2159 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcatgacctaggactacactagagaagtggggaat
AF054667       2159 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcatgacctaggactacactagagaagtggggaat
AF054668       2159 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcatgacctaggactacactagagaagtggggaat
AF054665       2159 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcatgacctaggactacactagagaagtggggaat
AF054664       2159 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcatgacctaggactacactagagaagtggggaat
AF295544       2136 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcatgacctaggactacactagagaagtggggaat
BR5MNP         1052 aagctctgggttctctgggtgacctctatactcaccattatacctagtctctgcagcatgacctaggactacactagagaagtggggaat

```

Figura 13. Alineamiento de la construcción pVR5B7 con secuencias reportadas en GenBank del VR5B.

```

pHVB1          1 -----ttgtggacctaaacctcagc
AJ004801       57498 -----ttgtggacctaaacctcagc
JX898220       57601 tacgtgtactacgagaactacgcgtacgtgcccgggtcccgcctcgcggagctggaggtgatcagcactttgtggacctaaacctcagc
NC_001847       57498 -----ttgtggacctaaacctcagc

pHVB1          21 gtcttgaggaccgaggtctctgcccctagaagtgtacacgcgcgcgcgagctcgcgcacacgggtctgctcgactac-----
AJ004801       57518 gtcttgaggaccgaggtctctgcccctagaagtgtacacgcgcgcgcgagctcgcgcacacgggtctgctcgactacagcgagatagc
JX898220       57691 gtcttgaggaccgaggtctctgcccctagaagtgtacacgcgcgcgcgagctcgcgcacacgggtctgctcgactacagcgagatagc
NC_001847       57518 gtcttgaggaccgaggtctctgcccctagaagtgtacacgcgcgcgcgagctcgcgcacacgggtctgctcgactacagcgagatagc

```

Figura 14. Alineamiento de la construcción pHVB1-17 con secuencias reportadas en GenBank del VHB-1.

```

pLVB9          112 -----ccctggcctactttcagaccccccttga
AF033818       3093 -----ccctggcctactttcagaccccccttga
BLVGAGA       3093 -----ccctggcctactttcagaccccccttga
HE967303       3241 cctacgtacacctaacccgggcagggtccaccctggtactcttccaaaagggcgctcaatttccctggcctactttcagaccccccttga
HE967302       3241 cctacgtacacctaacccgggcagggtccaccctggtactcttccaaaagggcgctcaatttccctggcctactttcagaccccccttga
HE967301       3241 cctacgtacacctaacccgggcagggtccaccctggtactcttccaaaagggcgctcaatttccctggcctactttcagaccccccttga
EF600696       3241 cctacgtacacctaacccgggcagggtccaccctggtactcttccaaaagggcgctcaatttccctggcctactttcagaccccccttga
BLVCG         3241 gtacacctaacccgggcagggtccaccctggtactcttccaaaagggcgctcaatttccctggcctactttcagaccccccttga
strainArg41    3241 tacgtacacctaacccgggcagggtccaccctggtactcttccaaaagggcgctcaatttccctggcctactttcagaccccccttga
BLVGPE        3241 cgtacacctaacccgggcagggtccaccctggtactcttccaaaagggcgctcaatttccctggcctactttcagaccccccttga

pLVB9          85 ctgacaaccaagcctcaccttggggcctccttctctgctgggatgccaataacctgcagactcaggccttaagctcttatgcca-----
AF033818       3120 ctgacaaccaagcctcaccttggggcctccttctctgctgggatgccaataacctgcagactcaggccttaagctcttatgccaagccca
BLVGAGA       3120 ctgacaaccaagcctcaccttggggcctccttctctgctgggatgccaataacctgcagactcaggccttaagctcttatgccaagccca
HE967303       3331 ctgacaaccaagcctcaccttggggcctccttctctgctgggatgccaataacctgcagactcaggccttaagctcttatgccaagccca
HE967302       3331 ctgacaaccaagcctcaccttggggcctccttctctgctgggatgccaataacctgcagactcaggccttaagctcttatgccaagccca
HE967301       3331 ctgacaaccaagcctcaccttggggcctccttctctgctgggatgccaataacctgcagactcaggccttaagctcttatgccaagccca
EF600696       3331 ctgacaaccaagcctcaccttggggcctccttctctgctgggatgccaataacctgcagactcaggccttaagctcttatgccaagccca
BLVCG         3326 ctgacaaccaagcctcaccttggggcctccttctctgctgggatgccaataacctgcagactcaggccttaagctcttatgccaagccca
strainArg41    3329 ctgacaaccaagcctcaccttggggcctccttctctgctgggatgccaataacctgcagactcaggccttaagctcttatgccaagccca
BLVGPE        3327 ctgacaaccaagcctcaccttggggcctccttctctgctgggatgccaataacctgcagactcaggccttaagctcttatgccaagccca

```

Figura 15. Alineamiento de la construcción pLVB9 con secuencias reportadas en GenBank del VLVB.

5.4. PCR y RT-PCR tiempo real

5.4.1. Especificidad

Para comprobar la especificidad de las sondas empleadas en PCR y RT-PCR tiempo real se realizó extracción de ácidos nucleicos a partir de virus de referencia y se sometieron a PCR tiempo real en cada corrida como control positivo se incluyó el control estándar de cuantificación. Para cada uno de los virus en estudio se observó que las sondas sintetizadas realmente reconocían la secuencia de los virus de referencia.

5.4.2. Sensibilidad

La metodología empleada para establecer el límite mínimo de detección para cada uno de los virus en estudio fue a partir de los controles estándar de cuantificación absoluta, los cuales fueron cuantificados mediante espectrofotometría y después llevados a una concentración inicial de 1ng/μl, posteriormente se realizaron diluciones logarítmicas (10^{-1} - 10^{-8}) y sometidas a reacción de PCR tiempo real.

Para el pDVBI.9, el número mínimo de copias detectado fue de 2990 (10^6) (figura 16), la eficiencia de reacción fue de 0.77, y el valor obtenido a partir del control estándar para la pendiente de la curva fue de -4.01, mostrando una correlación lineal $R^2=0.98$.

La sensibilidad para pDVBI.19 fue de 299 copias (10^7) (figura 17), con una eficiencia de reacción de 1.08, siendo -3.24 el valor de la pendiente obtenido a partir de la curva y una correlación lineal $R^2=0.95$.

La sensibilidad detectada a partir del pRSB7 fue 316 copias (10^7) (figura 18), con una eficiencia de reacción de 1.08, el valor de la pendiente de la curva fue -3.14 y una correlación lineal $R^2=0.97$.

La sensibilidad obtenida para el pLVB9 fue de 3040 (10^{-6}) copias (figura 19), con una eficiencia de reacción de 0.82, el valor de la pendiente obtenido a partir de la curva fue -3.83 con una correlación lineal $R^2=0.99$.

Para el caso del pHVB-1.17 el límite de detección mínimo fue 306 (10^{-7}) copias, con una eficiencia de reacción de 0.88, el valor de la pendiente de la curva obtenido fue -3.24 con una correlación lineal $R^2=0.97$ (figura 20).

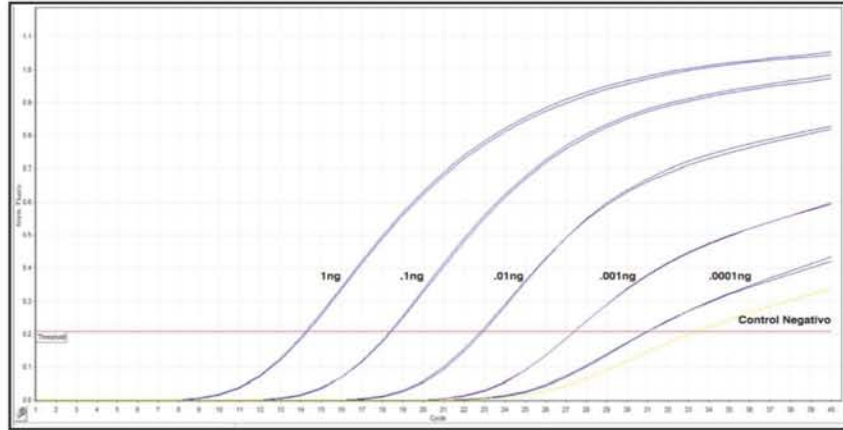


Figura 16. Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pDVBI.9. Las líneas de color azul corresponden a cada uno de los puntos de amplificación con las concentraciones de ADN diluido (10^{-2} – 10^{-6}). La línea color amarillo corresponde al control negativo.

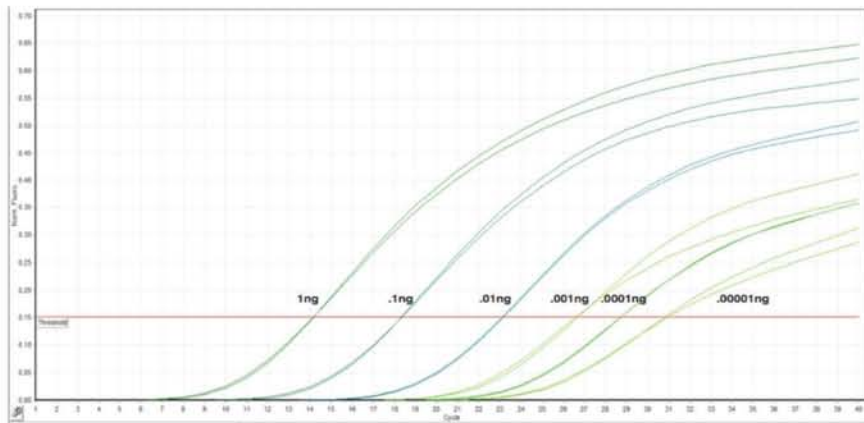


Figura 17. Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pDVBI.19. Las líneas de color verde corresponden a cada uno de los puntos de amplificación con las concentraciones de ADN diluido (10^{-2} – 10^{-7}).

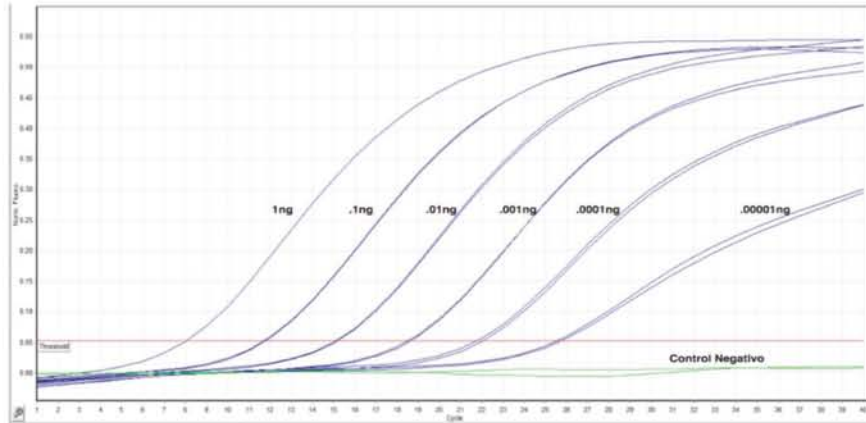


Figura 18. Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pRSV7. Las líneas de color azul corresponden a cada uno de los puntos de amplificación con las concentraciones de ADN diluido (10^{-2} – 10^{-7}). La línea color verde corresponde al control negativo.

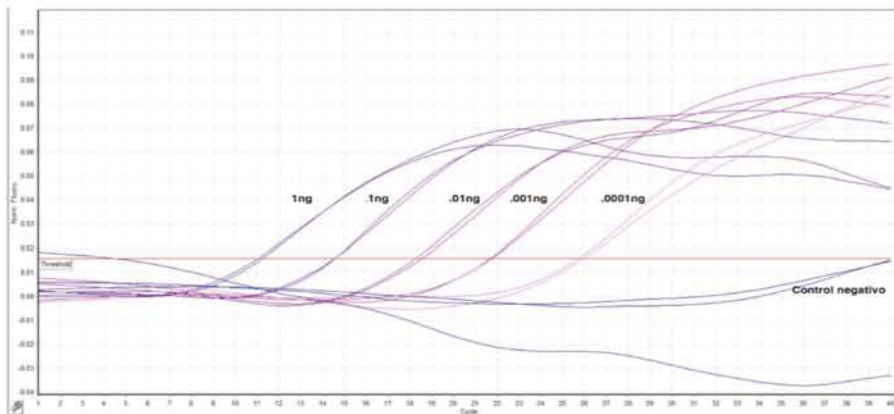


Figura 19. Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pLVB9. Las líneas de color morado corresponden a cada uno de los puntos de amplificación con las concentraciones de ADN diluido (10^{-2} – 10^{-6}). La línea color azul corresponde al control negativo.

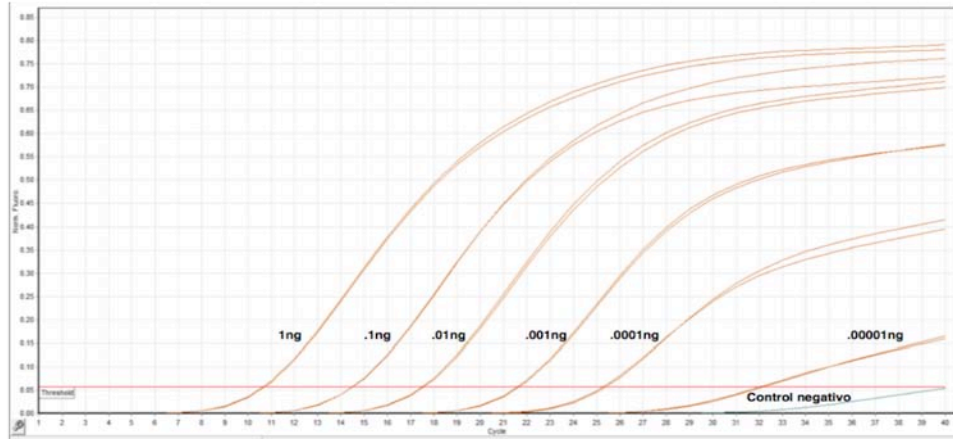


Figura 20. Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pHVB-1.17. Las líneas de color naranja corresponden a cada uno de los puntos de amplificación con las concentraciones de ADN diluido (10^{-2} – 10^{-7}). La línea color gris corresponde al control negativo.

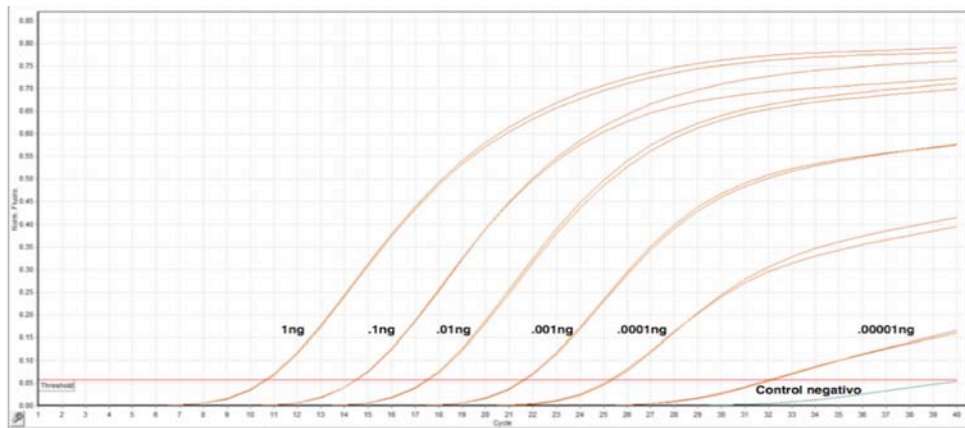


Figura 21. Curva típica de amplificación y cuantificación para el plásmido pPIB3.10. Las líneas de color naranja corresponden a cada uno de los puntos de amplificación con las concentraciones de ADN diluido (10^{-2} – 10^{-7}). La línea color gris corresponde al control negativo.

5.4.3. Repetibilidad

Para verificar la repetibilidad se utilizaron los controles de cuantificación estándar construidos; los cuales se diluyeron de manera logarítmica y posteriormente fueron sometidos a PCR tiempo real, cada uno de los puntos de las curvas se corrieron por triplicado en tres ocasiones diferentes bajo las mismas condiciones. Para determinar la variabilidad intra ensayo se tomaron

en cuenta los valores obtenidos de Coeficiente de Variación (CV) de cada uno de los ensayos.

Los valores de CV obtenidos a partir del pDVBI.9 (Figura 22), mostraron valores van de un rango de 0.02% a 4.59% (Cuadro 3); para el ensayo del pDVBI.19 (Figura 23), se obtuvieron valores de CV en un rango de 0.12% a 1.73% (Cuadro 4); los valores obtenidos de CV para el pRSV7 (Figura 24), estuvieron en un rango de 0.07% a 4.73% (Cuadro 5); los valores de CV obtenidos para el pLVB9 (Figura 25) estuvieron en rango de 0.28% hasta 13% (Cuadro 6); Finalmente para el pHVB-1.17 (Figura 26) los valores obtenidos de CV estuvieron en un rango de 0.09% a 1.80% (Cuadro 7).

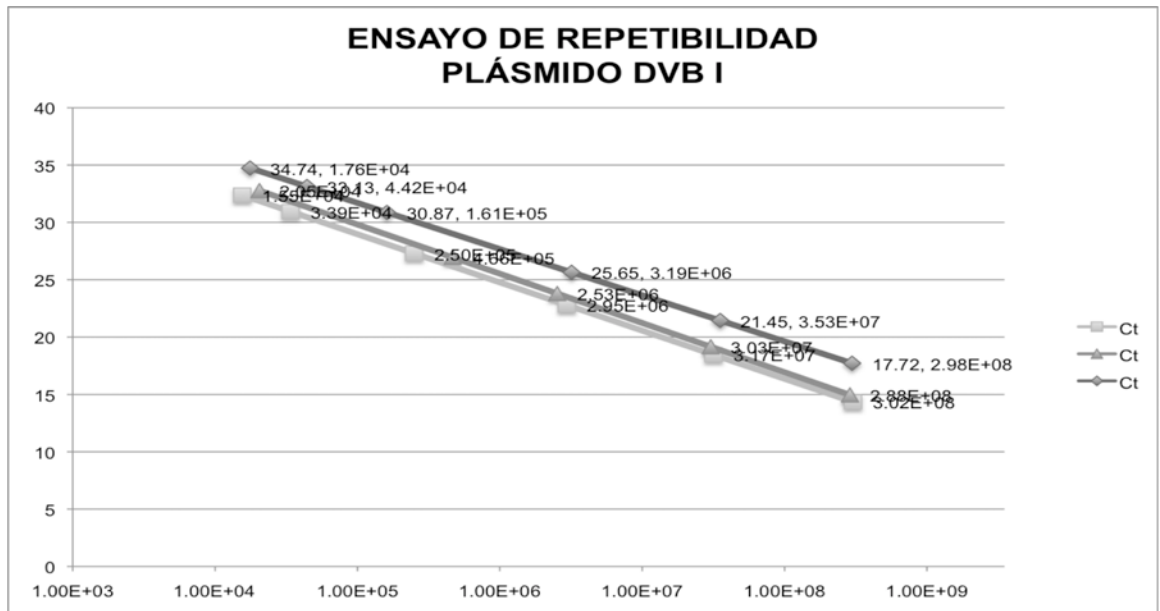


Figura 22. Ensayo de repetibilidad para el pDVBI.9.

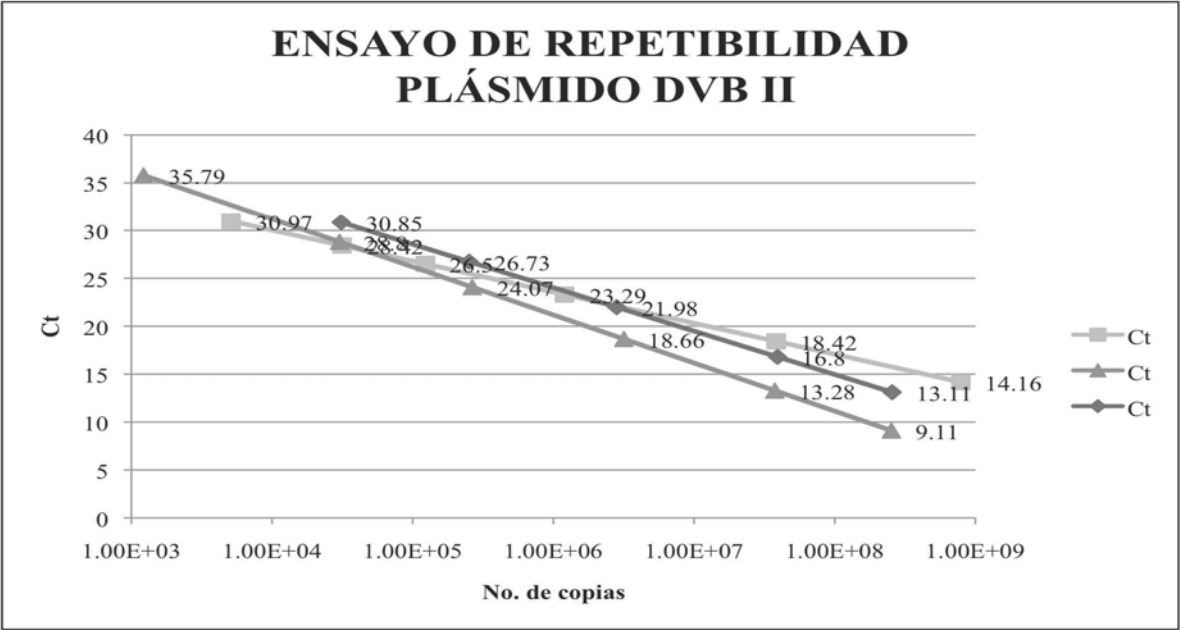


Figura 23. Ensayo de repetibilidad para el pDVBII.19.

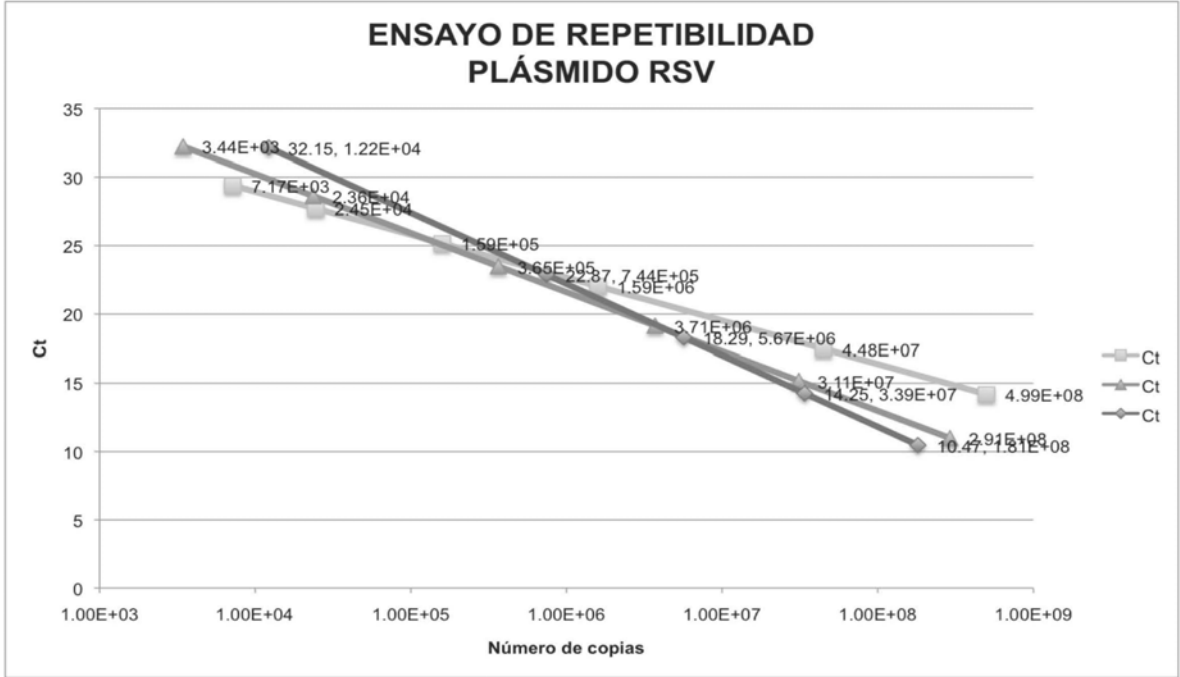


Figura 24. Ensayo de repetibilidad para el pRSV7.

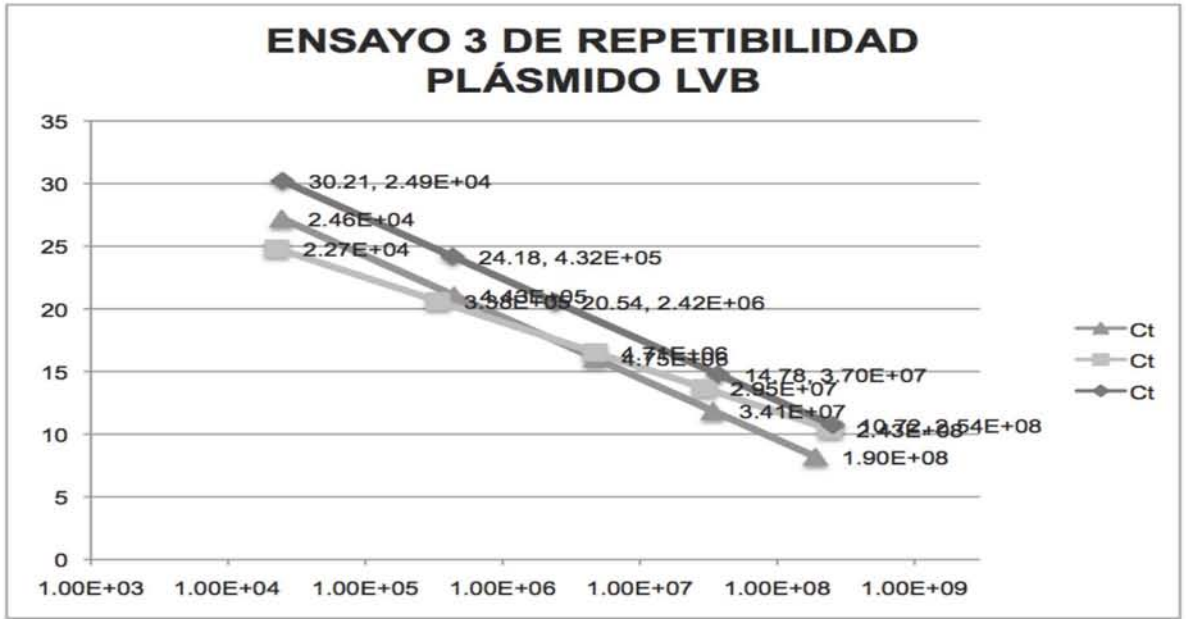


Figura 25. Ensayo de repetibilidad para el pLVB9.

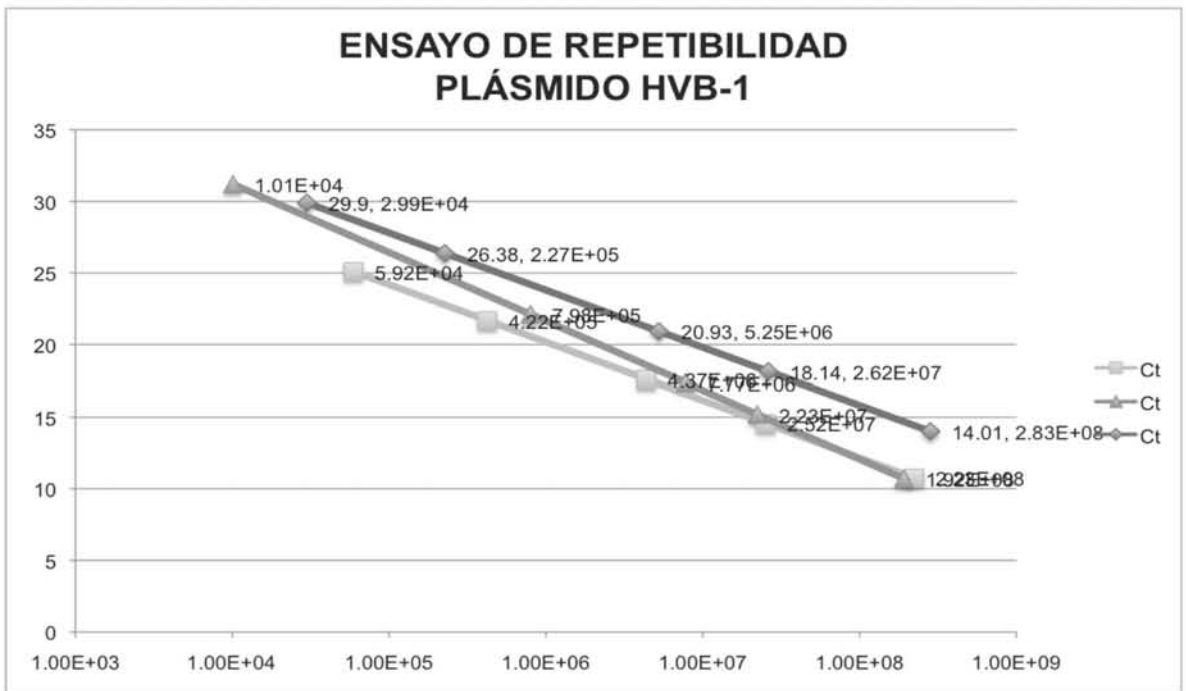


Figura 26. Ensayo de repetibilidad para el pHVB-1.17.

No. de copias	Variación intra ensayo								
	EXPERIMENTO								
	I			II			III		
	Mean Cq	SD	CV (%)	Mean Cq	SD	CV (%)	Mean Cq	SD	CV (%)
1.00E+00	53.17	0.08	0.15	44.89	0.01	0.02	43.05	0.09	0.21
1.00E-01	64.36	0.27	0.42	57.49	0.22	0.38	55.39	0.08	0.14
1.00E-02	76.96	0.09	0.12	71.39	0.45	0.63	68.39	0.17	0.25
1.00E-03	92.62	0.19	0.21	80.86	0.63	0.78	81.90	0.22	0.27
1.00E-04	99.40	0.81	0.81	65.54	3.01	4.59	92.85	0.13	0.14
negativo	104.23	0.88	0.84	0.00	0.00	0.00	97.14	0.90	0.93

Cuadro 3. Variación intra ensayo para el pDVBI.9. En el cuadro se muestran Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación. De los ensayos que se corrieron por triplicado en tres ocasiones diferentes. Los valores obtenidos son a partir del número de copias detectado en cada uno de los ensayos.

No. de copias	Variación intra ensayo								
	EXPERIMENTO								
	I			II			III		
	Mean Cq	SD	CV (%)	Mean Cq	SD	CV (%)	Mean Cq	SD	CV (%)
1.00E+00	42.48	0.05	0.12	27.34	0.19	0.69	39.33	0.25	0.64
1.00E-01	55.26	0.1	0.18	39.82	0.45	1.13	50.41	0.36	0.71
1.00E-02	69.88	0.25	0.36	55.98	0.31	0.55	43.95	0.76	1.73
1.00E-03	79.50	0.28	0.35	72.20	0.86	1.19	53.45	0.28	0.52
1.00E-04	85.25	0.58	0.68	57.60	0.77	1.34	92.56	0.59	0.64
1.00E-05	92.93	0.15	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro 4. Variación intra ensayo para el pDVBI.19. En el cuadro se muestran Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación. De los ensayos que se corrieron por triplicado en tres ocasiones diferentes. Los valores obtenidos son a partir del número de copias detectado en cada uno de los ensayos.

No. de copias	Variación intra ensayo								
	EXPERIMENTO								
	I			II			III		
	Mean Cq	SD	CV (%)	Mean Cq	SD	CV (%)	Mean Cq	SD	CV (%)
1.00E+00	42.56	0.35	0.82	31.39	0.07	0.22	32.92	0.30	0.91
1.00E-01	52.43	0.62	1.18	42.75	0.18	0.42	45.48	0.12	0.26
1.00E-02	66.10	0.14	0.21	54.86	0.14	0.26	57.44	0.18	0.31
1.00E-03	75.51	0.36	0.48	68.60	0.39	0.57	70.47	0.07	0.10
1.00E-04	83.17	0.36	0.43	96.46	4.73	4.90	85.88	0.07	0.08
1.00E-05	88.20	0.26	0.29	0.00	0.00	0.00	96.69	0.46	0.48

Cuadro 5. Variación intra ensayo para el pRSV7. En el cuadro se muestran Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación. De los ensayos que se corrieron por triplicado en tres ocasiones diferentes. Los valores obtenidos son a partir del número de copias detectado en cada uno de los ensayos.

No. de copias	Variación intra ensayo								
	EXPERIMENTO								
	I			II			III		
	Mean Cq	SD	CV (%)	Mean Cq	SD	CV (%)	Mean Cq	SD	CV (%)
1.00E+00	24.61	0.28	1.14	10.39	1.35	13.00	10.72	0.03	0.28
1.00E-01	11.85	0.33	2.78	13.67	0.32	2.34	14.79	0.53	3.58
1.00E-02	16.04	0.20	1.25	16.51	0.68	4.12	20.54	0.55	2.68
1.00E-03	21.08	0.29	1.38	20.61	0.55	2.67	24.18	1.27	5.25
1.00E-04	27.21	2.21	8.12	24.81	0.99	3.99	30.21	0.48	1.59

Cuadro 6. Variación intra ensayo para el pLVB9. En el cuadro se muestran Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación. De los ensayos que se corrieron por triplicado en tres ocasiones diferentes. Los valores obtenidos son a partir del número de copias detectado en cada uno de los ensayos.

No. de copias	Variación intra ensayo								
	EXPERIMENTO								
	I			II			III		
	Mean Cq	SD	CV (%)	Mean Cq	SD	CV (%)	Mean Cq	SD	CV (%)
1.00E+00	32.29	0.11	0.34	32.13	0.10	0.31	42.03	0.34	0.81
1.00E-01	43.68	0.05	0.11	45.58	0.47	1.03	54.42	0.15	0.28
1.00E-02	52.84	0.12	0.23	52.14	0.15	0.29	62.78	1.13	1.80
1.00E-03	65.05	0.06	0.09	66.34	0.07	0.11	79.14	0.43	0.54
1.00E-04	75.34	0.41	0.54	93.59	0.91	0.97	29.90	0.00	0.00

Cuadro 7. Variación intra ensayo para el pHVB-1.17. En el cuadro se muestran Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación. De los ensayos que se corrieron por triplicado en tres ocasiones diferentes. Los valores obtenidos son a partir del número de copias detectado en cada uno de los ensayos.

5.4.4. Comparación del número de copias y el título viral

Cuadro 9. Comparación del número de copias y el título viral

Virus	Título TCID ₅₀ /ml	No. de copias/ml
VDVBI	1x10 ^{6.2}	6.08x10 ⁶
VRSB	1x10 ^{5.2}	3.59x10 ⁶
HVB-1	1x10 ^{5.8}	1.28x10 ⁷
VPIB-3	1x10 ^{6.3}	ND
VLVB	ND	4.62x10 ¹

6. DISCUSIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) es actualmente una herramienta diagnóstica que permite detectar cantidades mínimas de ácidos nucleicos con el empleo de curvas de cuantificación estándar calibradas adecuadamente, debido al proceso de amplificación exponencial de la plantilla de RNA/DNA y el uso de moléculas emisoras de fluorescencia, por medio del cual menos de 10 copias de cualquier transcripto pueden ser detectadas de manera rápida en un termociclador acoplado con un sistema de captación de fluorescencia, permitiendo de esta forma el monitoreo de cargas virales y la cinética de la proliferación viral, convirtiéndose en un parámetro importante para el manejo, control y vigilancia de las infecciones virales.

El inventario ganadero bovino, tanto productor de carne como de leche, en México es el segundo más importante en número y en producción; dada esta condición es indispensable que todas las medidas zootécnicas, nutricionales, clínicas y de bioseguridad se enfoquen a mantener en equilibrio las unidades de producción; basadas en un monitoreo adecuado de las enfermedades presentes al interior de las mismas, para así evitar pérdidas económicas por tratamientos médicos y muerte de los animales.

En el país recientemente se han desarrollado ensayos diagnósticos enfocados a infecciones virales de interés clínico veterinario, sin embargo éstos se basan en técnicas cualitativas como inmunoenzimáticas, serológicas y moleculares PCR y RT PCR punto final. Por ello surge el interés de incursionar con ensayos alternativos como PCR y RT-PCR en tiempo real, los cuales precisan ser más específicos, sensibles, rápidos y fiables con la gran ventaja de ser cuantificables.

La metodología desarrollada en este trabajo permitió estandarizar los ensayos moleculares de PCR-TR y RT-PCR-TR para virus de interés sanitario y económico en el país como lo son: virus de la diarrea viral bovina genotipos I

y II (VDVB) los cuales se pueden genotipificar mediante discriminación alélica, el virus respiratorio sincitial bovino (VRSB), el virus de la parainfluenza bovina tipo 3 (VPIB-3), herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) y el virus de la luecocis viral bovina (VLVB).

Se utilizaron iniciadores y sondas reportados previamente en la literatura los cuales son dirigidos a regiones conservadas como la 5'UTR del VDVB y genes que codifican para proteínas que se encuentran altamente conservadas en el VRSB y el VPIB-3 como la nucleoproteína (N); el gen que codifica para la glicoproteína B (gB) del HVB-1 y el gen de la polimerasa (*pol*) para el VLVB. A partir de los cuales con el empleo de vectores de clonación, se construyeron controles estándares de cuantificación absoluta.

Los títulos virales obtenidos con TCID_{50%} sirvieron como referencia para determinar la equivalencia de número de copias obtenidas con RT-PCR-TR y PCR-TR a Unidades Virales, esto con la finalidad de saber cuantas moléculas completas del virus son necesarias para que puedan ser detectadas por PCR-TR y RT-PCR-TR.

La especificidad de los iniciadores y sondas se determinó a partir de los virus de referencia con los cuales se contaba en el laboratorio, observando que no había amplificaciones inespecíficas en los tubos con muestras de ácidos nucleicos diferentes al virus evaluados así como en tubos de controles negativos, el nivel de fluorescencia detectado en los ensayos de PCR-TR y RT-PCR-TR fue nulo.

La sensibilidad observada a partir del pDVBI.9 2990 copias (10^{-6}) con una eficiencia de reacción de 0.77 o 77% y un valor de la pendiente de -4.02, muestran que no son del todo consistentes ya que el valor de la pendiente no está relacionado a los valores teóricos esperados (-3.32), así como los de la eficiencia de reacción para la cual el valor ideal es de 1 y este valor equivale a un 100%, valores que pueden verse directamente afectados por la formación

de estructuras secundarias del templado o por inhibidores presentes en la reacción. Sin embargo los resultados obtenidos a partir de la repetibilidad, muestran que es un ensayo altamente repetible ya que los valores de coeficiente de variación (rango de 0.02% a 4.59%) coinciden con lo reportado en la literatura el cual debe ser menor al 20%. En comparación con lo reportado por Letellier y colaboradores (2003), estudio a partir del cual se tomaron las secuencias de iniciadores y sondas, el límite de detección para el control del VDVB1 fue de 1000 copias con una pendiente de -3.48 y una $R^2=0.9971$, se debe tomar en consideración que Letellier construyó sus curvas de cuantificación absoluta a partir de cDNA y en el presente estudio fue a partir de plásmido de DNA. Lo que respecta al límite de detección del pDVBI.19 299 copias (10^7), con una eficiencia de reacción 1.08 ó 108%, pendiente de -3.24 y una $R^2=0.95$ presentan una mayor concordancia con los valores obtenidos por Letellier y colaboradores (2003), además los valores obtenidos de coeficiente de variación fueron buenos (rango de 0.12% a 1-73%) garantizando la repetibilidad. Finalmente el ensayo de discriminación alélica el cual sirve para genotipificar los virus de la diarrea viral bovina, funcionó correctamente demostrando que no había solapamiento de las longitudes de onda emitidas por la fluorescencia de los fluorocromos con los cuales fueron marcadas las sondas para dicho ensayo, además de ser específicas para cada uno de los plásmidos construidos.

La sensibilidad obtenida para el pRSV7 316 copias (10^7) con una eficiencia de reacción de 1.08 ó 108%, el valor de la pendiente de -3.14 y una correlación lineal $R^2=0.975$ fueron resultados satisfactorios ya que el valor de la pendiente es muy cercano al estipulado en la literatura, aunque el valor obtenido de R^2 no es cercano a 1, sí cae en el rango esperado mostrando una adecuada regresión lineal, el valor mínimo aceptado es 0.92, demostrando por otra parte que la eficiencia de reacción es buena, ya que el valor obtenido nos garantiza que cada ensayo que se repita estaremos asegurando que el 100 por ciento de nuestro RNA o DNA será amplificado de manera exponencial durante cada ciclo. Los resultados correspondientes a la repetibilidad fueron satisfactorios

(rango de 0.07% a 4.73%) asegurando que éste ensayo es altamente repetible. Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los de Boxus y colaboradores (2005), trabajo a partir del cual se obtuvieron las secuencias de iniciadores y sonda, se observa que los resultados son similares ya que el límite mínimo detectado por estos autores fue de 100 copias de RNA. Ambos resultados son consistentes con lo reportado por Achenbach y colaboradores (2004). Sin embargo, Willoughby y colaboradores (2008) Reportan un límite de sensibilidad de 10 copias de RNA. Lo cual nos muestra que los resultados pueden variar, siendo los factores que desencadenan ésta variación: el tipo de ensayo, RT-PCR-TR en un solo paso ó en dos, el empleo de controles de cuantificación transcritos de RNA o plásmidos de DNA, los tipos de sondas y marcadores empleados, las plataformas para realizar las reacciones de PCR tiempo real y finalmente el método de extracción de ácidos nucleicos.

A partir del plásmido pLVB9 se pudo detectar una sensibilidad de 3040 copias (10^{-7}) con una eficiencia de reacción de 0.82 ó 82% y una pendiente de -3.83 con una correlación lineal $R^2=0.990$, aunque los resultados de la pendiente de la curva en conjunto con su correlación lineal son buenos, la eficiencia de reacción no fue la mejor. Respecto a la repetibilidad, ésta regular (0.28% a 13%), ya que llega hasta un 13% de CV aunque el valor aún está por debajo del 20% ya se considera elevado. Los resultados obtenidos en este estudio en comparación con los de Heenemann y colaboradores (2012), no son del todo relacionados ya que ellos lograron establecer un límite de detección superior (1 a 5 moléculas). Lo cual nos muestra que la variación significativa, tomando en cuenta el valor de la eficiencia de reacción podemos decir que los reactivos no están siendo utilizados de manera adecuada al momento de llevarse a cabo la reacción dentro del termociclador y finalmente quizá la síntesis de las sondas no fue la adecuada, ya que los gráficos obtenidos muestran que inmediatamente de la fase lineal de la PCR tiempo real la sonda empieza a ser inestable, indicando una emisión de fluorescencia no del todo adecuada la cual puede alterar los resultados, aunque el software de análisis realice los ajustes necesarios.

La sensibilidad detectada a partir del plásmido pHVB-1.17 fue de 306 copias (10^7) con una eficiencia de reacción de 0.88 ó 88%, un valor de pendiente muy cercano a lo establecido en literatura de -3.24 y una correlación lineal $R^2=0.953$, siendo éste último valor aceptable, lo que se observa es que la igual que en los ensayos anteriores específicos para los otros virus el valor de la eficiencia de reacción es bajo. Los valores de coeficiente de variación obtenidos nos indican que realmente es un ensayo repetible (0.09% a 1.80%). El experimento llevado a cabo por Wang y colaboradores (2007), no muestran resultados en base al número de copias, pero concuerdan los valores de coeficiente de variación. Cabe mencionar que Wang así como otros investigadores han empleado éstas secuencias de iniciadores y sondas, lo cual nos muestra que es un ensayo altamente reproducible y repetible y que los factores por los cuales los resultados pueden ser variables son diferentes.

7. CONCLUSIONES

Finalmente se concluye que los objetivos establecidos en el trabajo de investigación se completaron, invariablemente a los resultados esperados y a los obtenidos.

8. Literatura citada

1. [.http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&item_id=369](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&item_id=369) (fuente: SIAP, SAGARPA, 2012)
2. Achenbach, J.E., Topliff, C.L., Vassilev, V.B., Donis, R.O., Eskridge, K.M., Kelling, C.L., 2004. Detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus using real time quantitative RT-PCR and quantitative competitive RT-PCR assays. *J. Virol. Methods* 121, 1–6.
3. Agapov E, Murray C, Frolov I, Qu L, Myers T. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. *J virol* 2004; 78: 2414-2425.
4. Ames T.R., The epidemiology of BRSV infection, *Vet. Med.* (1993) 88:881–885.
5. Arslanagic E., Matsumoto M., Suzuki K., Nerome K., Tsutsumi H., Hung T. 1996. Maturation of respiratory syncytial virus within HEp-2 cell cytoplasm, *Acta Virol.* 40:209–214.
6. Atreya P.L., Peeples M.E., Collins P.L. 1998. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication, *J. Virol.* 72:1452–1461.
7. Avalos-Ramirez R., Orlich M., Thiel H.J., and Becher P. Evidence for the Presence of Two Novel Pestivirus Species. *Virology* 286, 456–465 (2001).
8. Bailly, J. E., J. M. McAuliffe, M. H. Skiadopoulos, P. L. Collins, and B. R. Murphy. 2000. Sequence determination and molecular analysis of two strains of bovine parainfluenza virus type 3 that are attenuated for primates. *Virus Genes* 20:173–182.
9. Baker JC, Frey ML. Bovine respiratory syncytial virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1985; 1(2):259-275.
10. Baker, J.C., 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. North Am.* 11 (3), 425–445.
11. Barajas, R.J.A., 1995. Seroepidemiología de enfermedades infecciosas en ganado bovino en el trópic mexicano. XIX Congreso Nacional de Buiatría, Coahuila, México, Agosto 24–26, pp. 9–27.

12. Becher P, Orlich M, Thiel HJ. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: Generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J virology* 2001; 75: 6255- 6264.
13. Belknap E., Baker J.C., Patterson J.S., Walker R.D., Haines D.M., Clark E.G. 1991. The role of passive immunity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves, *J. Infect. Dis.* 63:470–476.
14. Belknap E.B., Recognizing the clinical signs of BRSV infection, *Vet. Med.* (1993) 88:883–887.
15. Benfelt S, Grummer B, Wilke G. No caspase activation but overexpression of Bcl-2 in bovine cells infected with non-cytopathic Bovine Virus Diarrhea Virus. *Vet Microbiology* 2003; 96: 313-326
16. Bermingham A., Collins P.L. 1999. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:11259–11264.
17. Bolin S, Grooms D. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Vet Clin Food Anim* 2004; 20: 51-86.
18. Brackenbury L, Carr B, Charleston B. Aspects of innate and adaptive immune responses to acute infections with Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Microbiol* 2003; 96: 337-44.
19. Brown G., Aitken J., Rixon H.W.M., Sugrue R.J. 2002. Caveolin-1 is incorporated into mature respiratory syncytial virus particles during virus assembly on the surface of virus-infected cells, *J. Gen. Virol.* 83:611–621.
20. Bryson D.E., Necropsy findings associated with BRSV pneumonia, *Vet. Med.* (1993) 88:894–899.
21. Bryson DG: Parainfluenza-3 Virus in Cattle. In *Virus infections in Ruminants*. Edited by Dinter Z, Morein B. Amsterdam: Elsevier publishers; 1990:319–333.
22. Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34: 597-601.

23. Callan, R. J., and F. B. Garry. 2002. Biosecurity and bovine respiratory disease. *Vet. Clin. Food Anim.* 18:57–77.
24. Campadelli-Fiume G., Cocchi F., Menotti L., Lopez M. 2000. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells, *Rev. Med. Virol.* 10:305–319.
25. Campbell J. Effect of bovine viral diarrhoea virus in the feedlot. *Vet Clin Food Anim* 2004; 20: 39-50.
26. Chase C, Elmowalis G, Yousif A. The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Vet Clin Food Anim* 2004; 20: 95- 114.
27. Choi K, Gallei A, Becher P, Rossmann M. The structure of Bovine Viral Diarrhoea Virus RNA-Dependent RNA polymerase and its amino-terminal domain. *Structure* 2006; 14: 1107-13.
28. Chow T.L., Molello J.A., Owen N.V., Abortion experimentally induced in cattle by infectious bovine rhinotracheitis virus, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* (1964) 144:1005–1007.
29. Collins P.L., Chanock R.M., Murphy B.R., Respiratory syncytial virus, in: Kriple D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields virology*, 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001, pp. 1443–1485.
30. Collins P.L., Hill M.G., Johnson P.R. 1990. The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro, *J. Gen. Virol.* 71:3015–3020.
31. Couvreur, B., Letellier, C., Collard, A., Quenon, P., Dehan, P., Hamers, C., Pastoret, P.P., Kerkhofs, P., 2002. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res.* 85, 17-28.
32. De Jong M.C.M., Van der Poel W.H.M., Kramps J.A., Brand A., Van Oirschot J.T., Quantitative investigation of population persistence and recurrent outbreaks of bovine respiratory syncytial virus on dairy farms, *Am. J. Vet. Res.* (1996) 57:628–633.

33. Dessen A., Volchkov V., Dolnik O., Klenk H-D., Weissenhorn W. Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *EMBO J* 2000;19:4228–36.
34. Dohner K., Wolfstein A., Prank U., Echeverri C., Dujardin D., Vallee R., Sodeik B. 2002. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport, *Mol. Biol. Cell.* 3:2795–2809.
35. Dorak MT. 2006. Real time PCR. Taylor and Francis Group. New York.
36. Dussault, A.A. & Pouliot, M. 2006. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biological Procedures Online* 8: 1-10.
37. Echevarría JE., Erdman DD., Meissner HC., Anderson L. Rapid molecular epidemiologic studies of human parainfluenza viruses based on direct sequencing of amplified DNA from a multiplex RT-PCR assay. *J Virol Methods.* 2000 Jul;88(1):105-9.
38. Edwards, K. J., Logan, Julie, & Saunders, Nick, 2004. *Real-Time PCR; An Essential Guide.* Horizon Bioscience Wymondham.
39. Eisa M., Karrar AE., Abdel Rahim AH. The occurrence of antibodies to parainfluenza3 virus in sera of some domestic animals of the Sudan. *Br Vet J* 1979, 135(2):192–197
40. Elahi S., Mehdy S., Shen S., Talbot B., Massie B., Harpin S., Elazhar Y. Recombinant adenovirus expressing the E2 protein of bovine viral diarrhea virus induce humoral and cellular immune responses. *Microbiology letters* 1999; 177: 159-166.
41. Ellis J. A. 2001. The immunology of the bovine respiratory disease complex. *Vet. Clin. Food Anim.* 17:535–549.
42. Elvander M. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus, *Vet. Rec.* (1996) 138:101–105.
43. Engels M., Ackermann M., Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections, *Vet. Microbiol.* (1996) 53:3–15.
44. Evans J.E., Cane P.A., Pringle C.R. 1996. Expression and characterisation of NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res.* 43:155–161.

45. Figueroa-Chávez D., Segura-Correa JC., García-Márquez LJ., Pescador-Rubio A., Valdivia-Flores AG. Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. . Trop Anim Health Prod
46. Fischer-Tenhagen C., Hamblin C., Quandt S., Frolich K. Serosurvey for selected infectious disease agents in free-ranging black and white rhinoceros in Africa. J Wildl Dis 2000, 36(2):316–323.
47. Flores, E.F., Ridpath, J.F., Weiblen, R., Vogel, F.S.F., Gil, L.H.V.G., 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. Virus Res. 87, 51-60.
48. Fredrickden B., Press C., Loken T. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle PI with BVDV. Vet Microbiology 1999; 64: 109 122.
49. Geraghty R.J., Krummenacher C., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Spear P.G. 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor, Science. 280:1618–1620.
50. Gerdts V., Beyer J., Lomniczi B., Mettenleiter T.C. 2000. Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence, J. Virol. 74:817–827.
51. Ghildyal R., Li D., Peroulis I., Shields B., Bardin PG., Teng MN., Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein. J Gen Virol 2005b;86:1879–84.
52. Grooms D. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. Vet Clin North Am 2004; 20:5-19.
53. Haanes EJ., Guimond P., Wardley R. The bovine parainfluenza virus type-3 (BPIV-3) hemagglutinin/neuraminidase glycoprotein expressed in baculovirus protects calves against experimental BPIV-3 challenge. Vaccine 1997, 15(6–7):730–738.

54. Hagglund S, Svensson C, Emanuelson U, Valarcher JF, Alenius S. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. *Vet J* 2006; 172: 320-328.
55. Hamers C., Dehan P., Couvreur B., Letellier C., Pastoret P. Diversity among Bovine Pestiviruses. *The Veterinary Journal* 2001; 161: 112- 22.
56. Hanon E., Keil G., van Drunen Littel-van den Hurk S., Griebel P., Vanderplasschen A., Rijsewijk F.A., Babiuk L., Pastoret P.P., Bovine herpesvirus 1-induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D, *Virology* (1999) 257:191–197.
57. Hardy R.W., Wertz G.W. 1998. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription, *J. Virol.* 72:520–526.
58. Heid CA., Stevens J, Livak KJ., y Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994
59. Hellen C., Breyne S. A distinct group of Hepacivirus/Pestivirus like Internal Ribosomal Entry Sites (IRES) in members of Diverse Picornavirus genera: Evidence for Modular Exchange of Functional Noncoding RNA elements by Recombination. *Journal of Virology* 2007; 81: 5850-5863
60. Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 1993;11:1026-30 .
61. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 1991;88:7276-80 .
62. <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html> Dorak, M.T. 2008. Real-Time PCR.
63. Hulst H., Gennip H., Vlot A., Schooten E., Smit A., Moormann R. Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated

- heparan sulfate: Role for virus replication in vivo and virulence. *Journal of virology* 2001; 75: 9585-95.
64. Iqbal M., Flick H., McCauley J. Interactions of Bovine Viral Diarrhea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. *Journal of general virology* 2000; 81: 451-459.
 65. Jones C., Geiser V., Henderson G., Jiang Y., Meyer F., Perez S., Zhang Y. 2006. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency, *Vet. Microbiol.* 113:199–210.
 66. Jones, L.R., Zandomeni, R., Weber, E.L., 2001. Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from Argentina. *Vet. Microbiol.* 81, 367-375.
 67. Karger A., Schmidt U., Buchholz U.J. 2001. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin, *J. Gen. Virol.* 82:631–640.
 68. Kathleen J. Coelingh R., Winter CC., Murphy BR., Rice JM., Kimball PC., Olmsted RA., and Collins PL. Conserved Epitopes on the Hemagglutinin-Neuraminidase Proteins of Human and Bovine Parainfluenza Type 3 Viruses: Nucleotide Sequence Analysis of Variants Selected with Monoclonal Antibodies. *Journal of Virology*, Oct. 1986, p. 90-96
 69. Kuo L., FeRNAs R., Collins P.L. 1997. Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasitemplated initiation at position 1 of the encoded mRNA, *J. Virol.* 71:4944–4953.
 70. Kuo L., Grosfeld H., Cristina J., Hill M.G., Collins P.L. 1996. Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus, *J. Virol.* 70:6892–6901.
 71. Lackner T., Muller A., Pankraz A., Becher P., Thiel HJ. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of RNA viral. *Journal of virology* 2004; 78:10765-10775.
 72. Lazar C., Zitzmann N., Dwek R., Branza N. The pestivirus Erns glycoprotein interacts with E2 both infected cells and mature virions. *Virology* 2003; 314: 696-705.

73. Leite F., Atapattu D., Kuckleburg C., Schultz R., Czuprynski C.J., Incubation of bovine PMNs with conditioned medium from BHV-1 infected peripheral blood mononuclear cells increases their susceptibility to *Mannheimia haemolytica* leukotoxin, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2005) 103:187–193.
74. Leptospirosis con cuatro enfermedades de importancia en bovinos. XXII Congreso Nacional de Buitria, Acapulco, Guerrero, México, pp. 46–48.
75. Lerch R.A., Anderson K., Amann V.L., Wertz G.W. 1991. Nucleotide sequence analysis of the bovine respiratory syncytial virus fusion protein mRNA and expression from a recombinant vaccinia virus, *Virology.* 181:118–131.
76. Levine S., Klaiber Franco R., Paradiso P.R. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus, *J. Gen. Virol.* 68:2521–2524.
77. Li Y., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L.A., Liang X. 1995. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB, *J. Virol.* 69:4758–4768.
78. Liang R., Babiuk L. Compatibility of plasmid encoding bovine viral diarrhea virus type 1 and type 2 E2 in a single DNA vaccine formulation. *Vaccine* 2007; 25: 5994-6006.
79. Liang X., Babiuk L.A., Zamb T.J. 1992. An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization, *Virology.* 189:629–639.
80. Liang X., Pyne C., Li Y., Babiuk L.A., Kowalski J. 1995. Delineation of the essential function of bovine herpesvirus 1 gD: an indication for the modulatory role of gD in virus entry, *Virology.* 207:429–441.
81. Liang X.P., Babiuk L.A., van Drunen Littelvan den Hurk S., Fitzpatrick D.R., Zamb T.J. 1991. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV, *J. Virol.* 65:1124–1132.

82. Ligas M.W., Johnson D.C. 1998. A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by betagalactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells, *J. Virol.* 62:1486–1494.
83. Loneragan GH., Dargatz DA., Morley PS., Smith MA. Trends in mortality ratios among cattle in US feedlots. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219(8): 1122-1127.
84. Lyon M., Leroux C., Greenland T., Chastang J., Patet J., Mornex JF. Presence of a unique parainfluenza virus 3 strain identified by RT-PCR in visna-maedi virus infected sheep. *Vet Microbiol* 1997, 57(23):95–104.
85. Mallipeddi S.K., Samal S.K. 1993. Sequence variability of the glycoprotein gene of bovine respiratory syncytial virus, *J. Gen. Virol.* 74: 2001–2004.
86. Mars M.H., Brusckhe C.J., van Oirschot J.T., Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions, *Vet. Microbiol.* (1999) 66:197–207.
87. Matus, P.G., Guiris, A.D., Orea, M.R., 1995. Estudio serológico y epizootológico de IBR, PI3 BRSV en sementales bovinos del estado de Chiapas. *Vet. Méx.* 26, 118.
88. Mendez E., Ruggli N., Collet M., Rice C. Infectious BVDV (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J virol* 1998; 72: 4737-45.
89. Mettenleiter T.C., Klupp B.G., Granzow H. 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes, *Curr. Opin. Microbiol.* 9:423–429.
90. Michelle M. Breker-Klassen, Dongwan Yoo, and Lorne A. Babiuk. Comparisons of the F and HN Gene- Sequences of Different Strains of Bovine Parainfluenza Virus Type 3: Relationship to Phenotype and Pathogenicity. *Can J Vet Res* 1996; 60: 228-236.
91. Miller J.M., Van der Maaten M.J., Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus, *Am. J. Vet. Res.* (1986) 47:223–228.

92. Moles, C.L., Aguirre, S.J., Gavaldon, R.D., Torres, B.J., Rojas, S.N., Cisneros, P.M., 1998. Serofrecuencia de
93. Money VA., McPhee HK., Mosley JA., Sanderson JM., Yeo RP. Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:4441–6.
94. Nagai, M., Hayashi, M., Sugita, S., Sakoda, Y., Mori, M., Murakami, T., Ozawa, T., Yamada, N., Akashi, H., 2004. Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhea viruses using five different genetic regions. *Virus Res.* 99, 103-113.
95. Ohsawa K., Yamada A., Takeuchi K., Watanabe Y., Miyata H., Sato H. Genetic characterization of parainfluenza virus 3 derived from guinea pigs. *J Vet Med Sci / the Japanese Soc Vet Sci* 1998, 60(8):919–922.
96. Okazaki K., Honda E., Kono Y. 1994. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIII by a recombinant baculovirus in insect cells, *J. Gen. Virol.* 75:901–904.
97. Okazaki K., Honda E., Kono Y. 1994. Heparinbinding domain of bovid herpesvirus 1 glycoprotein gIII, *Arch. Virol.* 134:413–419.
98. Olafson, P. and Rickard, C.G., 1947. Further Observations on the Virus Diarrhea (New Transmissible Disease) of Cattle. *Cornell Vet.*, 37, 104-106.
99. Park, J.S., Moon, H.J., Lee, B.C., Hwang, W.S., Yoo, H.S., Kim, D.Y., Park, B.K., 2004. Comparative analysis on the 5´-untranslated region of bovine viral diarrhea virus isolated in Korea. *Res. Vet. Sci.* 76, 157-163
100. Parks JB., Post G., Thorne T., Nash P. Parainfluenza-3 virus infection in Rocky Mountain bighorn sheep. *J Am Vet Med Assoc* 1972, 161(6):669–672.
101. Pastey M.K., Samal S.K. 1993. Structure and sequence comparison of bovine respiratory syncytial virus fusion protein, *Virus Res.* 29:195–202.
102. Pastey M.K., Samal S.K. 1995. Nucleotide sequence analysis of the non-structural NS1 (1C) and NS2 (1B) protein genes of bovine respiratory syncytial virus, *J. Gen. Virol.* 76:193–197.

103. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. Lihong Liu., Hongyan Xia., Niklas Wahlberg., Sándor Belák., Claudia Baule . *Virology* 385 (2009) 351–357.
104. Pizarro-Lucero, J., Celedon, M.O., Aguilera, M., de Calisto, A., 2006. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet. Microbiol.* 115, 208-217.
105. Potgieter L. Bovine Respiratory Tract Disease caused by Bovine Viral Diarrhea virus. *Vet Clin North Am* 1997; 13:471-481
106. Reisinger RC., Heddleston KL., Manthei CA. A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1959 Aug 1;135(3):147-52.
107. Reynolds A.E., Wills E.G., Roller R.J., Ryckman B.J., Baines J.D. 2002. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids, *J. Virol.* 76:8939–8952.
108. Ridpath JF, Nelly JD. Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhoea virus. *J virol* 2000; 74:8771-4
109. Ridpath, J.F., Bolin, S.R., Dubovi, E.J., 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205, 66-74.
110. Rijsewijk F.A., Kaashoek M.J., Langeveld J.P., Melen R., Judek J., Bienkowska-Szewczyk K., Maris-Veldhuis M.A., van Oirschot J.T., Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains, *J. Gen. Virol.* (1999) 80:1477–1483.
111. Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. & Wittwer, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160.
112. Robert A. Smith. *Feedlot Diseases and Their Control*. Veterinary Research and Consulting Services, LLC Stillwater, Oklahoma 74075. USA. Proceedings of the WBC Congress, Québec, Canada , 2004.

113. Samal S.K., Zamora M., Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus, *J. Gen. Virol.* (1991) 72:1715–1720.
114. Sandvik T. Selection and use laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prev Vet Medicine* 2005; 72: 3-16.
115. Saydam O., Abril C., Vogt B., Ackermann M., Schwyzer M. 2004. Transactivator protein BICP0 of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is blocked by prostaglandin D2 (PGD2), which points to a mechanism for PGD2-mediated inhibition of BHV-1 replication, *J. Virol.* 78:3805–3810.
116. Saydam O., Steiner F., Vogt B., Schwyzer M. 2006. Host cell targets of immediate-early protein BICP22 of bovine herpesvirus 1, *Vet. Microbiol.* 113:185–192.
117. Schmitt AP., He B., Lamb RA. Involvement of the cytoplasmic domain of the hemagglutinin-neuraminidase protein in assembly of the paramyxovirus simian virus 5. *J Virol* 1999;73:8703–12.
118. Schweizer M., Peterhans E. Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double stranded RNA induced apoptosis and interferon synthesis. *Journal Virology* 2001; 75: 4692-4698.
119. Skiadopoulos MA., Schmidt AC., Riggs JM., Surman SR., Elkins WR., Claire M.St., Collins PL., and Murphy BR. Determinants of the Host Range Restriction of Replication of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 in Rhesus Monkeys Are Polygenic.. *Journal of Virology*, Jan. 2003, p. 1141–1148.
120. Smith RA. 2004. Feedlot Diseases and Their Control. 23 Congreso Mundial de Buiatria. Quebec, Canada.
121. Snowden G. D., Van Vleck L. D., Cundiff L. V., Bennett G. L., Koohmaraie M., and Dikeman M. E. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Phenotypic, environmental, and genetic correlations with growth, carcass, and longissimus muscle palatability traits. *J Anim Sci* 2007, 85:1885-1892.

122. Solís-Calderón J.J., Segura-Correa J.C., Aguilar-Romero F., Segura-Correa V.M. A Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus-3 in beef cattle of Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 82 (2007) 102–110.
123. St-Louis M., Massie B., Archambault D. The Bovine Viral Diarrhea Virus NS3 protein, when expresses alone in mammalian cells, induces apoptosis which correlates with caspasa 8 y caspasa 9 activation. *Vet Res* 2005; 36: 213-217
124. Stevenson RG, Hore DE: Comparative pathology of lambs and calves infected with parainfluenza virus type 3. *J Comp Pathol* 1970, 80(4):613–618.
125. Stott E.J., Thomas L.H., Collins A.P., Crouch S., Jebbett J., Smith G.S., Luther P.D., Caswell R., A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease, *J. Hyg. (Lond.)* (1980) 85:257–270.
126. Sugahara F., Uchiyama T., Watanabe H., Shimazu Y., Kuwayama M., Fujii Y. Paramyxovirus Sendai virus-like particle formation by expression of multiple viral proteins and acceleration of its release by C protein. *Virology* 2004; 325:1–10.
127. Tajima, M., Frey, H.R., Yamato, O., Maede, Y., Moennig, V., Scholz, H., Greiser-Wilke, I., 2001. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res.* 76, 31–42.
128. Tawar RG., Duquerroy S., Vonrhein C., Varela PF., Damier-Piolle L., Castagné N. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 2009;326:1279–83.
129. Taylor G., Bruce C., Barbet A.F., Wyld S.G., Thomas L.H. 2005. DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves, *Vaccine.* 23:1242–1250.
130. Taylor G., Rijsewijk F.A.M., Thomas L.H., Wyld S.G., Gaddum R.M., Cook R.S., Morrison W.I., Hensen E., van Oirschot J.T., Keil G.

1998. Resistance to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induced in calves by a recombinant bovine herpesvirus-1 expressing the attachment glycoprotein of BRSV, *J. Gen. Virol.* 79:1759–1767.
131. Taylor G., Stott E.J., Furze J., Ford J., Sopp P. 1992. Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies, *J. Gen. Virol.* 73:2217–2223.
132. Taylor G., Thomas L.H., Furze J.M., Cook R.S., Wyld S.G., Lerch R., Hardy R., Wertz G.W. 1997. Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions, *J. Gen. Virol.* 78:3195–3206.
133. Teng M.N., Collins P.L. 1998. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper dependent infectious particles, *J. Virol.* 72:5707–5716.
134. Teng M.N., Whitehead S.S., Collins P.L. 2001. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo, *Virology.* 289:283–296.
135. Thomas L.H., Cook R.S., Wyld S.G., Furze J.M., Taylor G. 1998. Passive protection of gnotobiotic calves using monoclonal antibodies directed at different epitopes on the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus, *J. Infect. Dis.* 177:874–880.
136. Thomas L.H., Stott E.J., Collins A.P., Jebbett J. 1984. Experimental pneumonia in gnotobiotic calves produced by respiratory syncytial virus, *Br. J. Exp. Pathol.* 65:19–28.
137. Thomas L.H., Stott E.J., Jones P.W., Jebbett N.J., Collins A.P., The possible role of respiratory syncytial virus and *Pasteurella* spp. in calf respiratory disease, *Vet. Rec.* (1980) 107:304–307.
138. Thorsen J., Henderson JP. Survey for antibody to infectious bovine rhinotracheitis (IBR), bovine virus diarrhea (BVD) and parainfluenza 3 (PI3) in moose sera. *J Wildl Dis* 1971, 7(2):93–95.

139. Trigo, F.J., 1987. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Ciencia Veterinaria* 4, 1–36.
140. Turin L and Russo S (2003). BHV-1 infection in cattle: an update. *Veterinary Bulletin* 73: 16–21.
141. Valarcher J.-F., Schelcher F., Bourhy H. 2000. Evolution of bovine respiratory syncytial virus, *J. Virol.* 74:10714–10728.
142. Valarcher J.F., Bourhy H., Lavenu A., Bourges-Abella N., Roth M., Androletti O., Ave P., Schelcher F., Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus, *Virology* (2001) 291:55–67.
143. Valarcher JF and Taylor G. 2007. Review article: Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* 38:153–180.
144. Valasek, M.A. & Repa, J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 29: 151-159.
145. Verhoeff J., Van der Ban M., van Nieuwstadt A.P., Bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy cattle: clinical and haematological findings, *Vet. Rec.* (1984) 114:9–12.
146. Vilcek, S., Durkovic, B., Bobakova, M., Sharp, G., Paton, D.J., 2002. Identification of bovine viral diarrhoea virus 2 in cattle in Slovakia. *Vet. Rec.* 151, 150-152.
147. Vilcek, S., Paton, D.J., Durkovic, B., Strojny, L., Ibata, G., Moussa, A., Loitsch, A., Rossmanith, W., Vega, S., Scicluna, M.T., Palfi, V., 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146, 99–115.
148. Viuff B., Uttenthal A., Tegtmeier C., Alexandersen S., Sites of replication of bovine respiratory syncytial virus in naturally infected calves as determined by in situ hybridisation, *Vet. Pathol.* (1996) 33:383–390.
149. Walker, N.J. 2002. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 296: 557-559.
150. Waning DL, Schmitt AP, Leser GP, Lamb RA. Roles for the cytoplasmic tails of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in budding of the paramyxovirus simian virus 5. *J Virol* 2002;76:9284–97.

151. Watzinger F, Ebner K, Lion T. 2006. Review: Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 254–298.
152. Weber E., Humbert B., Streckert H.-J., Werchau H. 1995. Nonstructural protein 2 (NS2) of respiratory syncytial virus (RSV) detected by an antipeptide serum, *Respiration*. 62:27–33.
153. Willoughby K, Thomson K, Maley M, Gilray J, Scholes S, Howie F, Caldowd G, Nettleton PF. 2008. Development of a real time reverse transcriptase polymerase chain for the detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples and its comparison with immunohistochemistry and immunofluorescence antibody testing. *Veterinary Microbiology* 126: 264–270
154. Wirth U.V., Gunkel K., Engels M., Schwyzer M. 1989. Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts, *J. Virol.* 63:4882–4889.
155. Yener Z., Saglam YS., Timurkaan N., Ilhan F. Immunohistochemical detection of parainfluenza type 3 virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. *J Vet Med* 2005, 52(6):268–271.
156. Zhu YM., Shi HF., Gao YR., Xin JQ., Liu NH., Xiang WH., Ren XG., Feng JK., Zhao LP., Xue F. Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China. *Vet Microbiol* 2010, 149(3–4):446–451.
157. Zimmer G., Conzelmann K.-K., Herrler G. 2002. Cleavage at the furin consensus sequence RAK/KR109 and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture, *J. Virol.* 76:9218–9224.
158. Zimmer G., Rohn M., McGregor G.P., Schemann M., Conzelmann K.K., Herrler G. 2003. Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus, *J. Biol. Chem.* 278:46854–46861.

159. ZRNAke RL., Erickson GA. Serum antibody prevalence of parainfluenza 3 virus in a free-ranging bison (*Bison bison*) herd from Alaska. *J Wildl Dis* 1990, 26(3):416–419.