



Universidad
Zaragoza



Evaluación filogenética del virus de
la diarrea viral bovina (BVDV) en
animales infectados procedentes de
rebaños de la Península Ibérica

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Autora

Alba García Murillo

Directores

Alfredo Benito Zúñiga

María F. Fillat Castejón

Departamento de Biología Molecular y Celular

EXOPOL, Diagnóstico y Autovacunas Veterinarias

Año 2019



Universidad
Zaragoza



D. Alfredo Benito Zúñiga, Investigador responsable del Departamento de Biología Molecular y Celular de la empresa EXOPOL, Diagnóstico y Autovacunas Veterinarias, y D. María F. Fillat Castejón, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Máster “Evaluación filogenética del virus de la diarrea viral bovina (BVDV) en animales infectados procedentes de rebaños de la Península Ibérica” ha sido realizado por Alba García Murillo en el Departamento de Biología Molecular y Celular de la empresa EXOPOL, Diagnóstico y Autovacunas Veterinarias, bajo nuestra dirección y reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para ser presentado como Trabajo Fin de Máster (TFM), ya que cumple los objetivos recogidos en las directrices de TFM del Máster Universitario en Biología Molecular y Celular.

Zaragoza, Junio 2019

Fdo: Alfredo Benito Zúñiga

Fdo: María F. Fillat Castejón

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a *Alfredo Benito* y *María Fillat* por todos los conocimientos aportados durante la realización del presente trabajo fin de máster así como por su predisposición a ofrecerme ayuda siempre que lo he necesitado.

Por otro lado, he de agradecer a *Rafael Baselga*, quién amablemente me acogió en su empresa y me dio una oportunidad que, a día de hoy, me sigue pareciendo única. Gracias por confiar en mí y darme la posibilidad de vivir una experiencia que me ha permitido crecer no solo a nivel profesional sino también personal.

Siguiendo con el equipo de Exopol, siento especial gratitud hacia *Daniel Serrano*, *José Luis Arnal* y *Ani Muñoz*, quiénes siempre estuvieron dispuestos a prestarme su ayuda, aclarar mis dudas y satisfacer mis curiosidades. Tampoco me puedo olvidar del resto de *trabajadores de la empresa*, a quienes debo agradecer por el buen trato recibido y la creación de un ambiente de trabajo inmejorable.

Por otra parte, he de agradecer a *Jorge Guío* y *Emma Sevilla* por su ayuda, su amabilidad y sus consejos sobre clonaje que tan útiles me fueron.

Tampoco quisiera olvidarme de mis amigos, quienes han sido un apoyo importante a lo largo de todos estos meses. En especial, he de agradecer a *Nelia Jiménez* y *Joaquín Marco* por todos sus ánimos, sus consejos y sus sabias palabras que tanto me han enseñado. A ellos y a *David Giraldos*, gracias por hacer fácil lo difícil y ayudarme durante horas entre risas. También a *Blanca Urmeneta*, simplemente gracias por ser tú misma y darle otro color a la vida.

Por último, pero no menos importante, he de agradecer a *mis padres* y a *mis hermanos* por apoyarme, por siempre creer en mí y por animarme a perseguir mis sueños.

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 <i>Pestivirus</i>	4
2.2 Virus de la diarrea viral bovina.....	6
2.3 Morfología del virión.....	7
2.4 Genoma viral.....	8
2.4.1 Regiones no codificantes	8
2.4.2 Proteínas virales	9
2.4.2.1 Proteínas estructurales.....	10
2.4.2.2 Proteínas no estructurales.....	11
2.5 Ciclo de replicación viral	12
2.6 Patogénesis.....	12
2.7 Diagnóstico	14
2.8 Repercusión económica y control de la enfermedad.....	15
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Casos clínicos y muestras evaluadas.....	17
4.2 Extracción del RNA viral y determinación de la infección por <i>Pestivirus</i>	19
4.3 Determinación del genotipo de BVDV mediante RT-qPCR	20
4.4 Determinación del subgenotipo de BVDV mediante secuenciación	21
4.4.1 RT-PCR de la región 5'UTR	21
4.4.1.1 Amplificación de ácidos nucleicos	21
4.4.1.2 Visualización de los productos de amplificación.....	22
4.4.2 Purificación de cDNA a partir de gel de agarosa	22
4.4.3 Cuantificación del cDNA purificado a partir del gel de agarosa	23
4.4.4 Clonación de cDNA en el vector pGEM-T.....	23
4.4.4.1 Ligación	23
4.4.4.2 Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico.....	23

4.4.4.3	Comprobación de la incorporación del inserto mediante PCR	24
4.4.5	Secuenciación de Sanger.....	25
4.4.5.1	Obtención de las secuencias 5'UTR	25
4.4.6	Análisis filogenético	25
4.4.6.1	Búsqueda de secuencias de referencia	25
4.4.6.2	Construcción de árboles filogenéticos	26
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1	Evaluación de los casos clínicos: patología y edad más frecuente	27
5.2	Determinación del genotipo de BVDV presente en las muestras de los casos clínicos de España y de Portugal.....	28
5.3	Estudio de los subgenotipos de BVDV más frecuentes en España.....	31
5.3.1	Amplificación del fragmento a secuenciar de la región 5'UTR.....	31
5.3.1.1	Análisis de la muestra del caso clínico 20	33
5.3.2	Obtención de las secuencias consenso mediante secuenciación de Sanger	35
5.3.3	Análisis de homología de las muestras secuenciadas.....	37
5.4	Análisis filogenético	39
5.5	Discusión general.....	44
6.	CONCLUSIONES	46
7.	BIBLIOGRAFÍA	47

ANEXOS

1. RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) es el agente causal de la diarrea viral bovina (BVD), una enfermedad endémica que ocasiona importantes pérdidas económicas a la industria ganadera en países de todo el mundo. Existen dos genotipos diferentes de virus de BVD (BVDV-1 y BVDV-2) los cuales, a su vez, han sido divididos en numerosos subtipos tras haber sido evaluados filogenéticamente.

La identificación de los genotipos circulantes del BVDV en un país o región es de gran importancia pues brinda información epidemiológica que ayuda a mejorar programas de control y erradicación de este agente.

En este trabajo fin de máster, se ha determinado el genotipo de BVDV presente en muestras de 119 casos clínicos de bovino positivos a *Pestivirus*. Los casos evaluados proceden de diferentes rebaños de la Península Ibérica y han sido recibidos por el laboratorio Exopol durante los años 2015-2019. Además, se ha realizado un análisis filogenético de la región 5'UTR de los virus detectados para identificar los subgenotipos de BVDV circulantes y se ha evaluado el tipo de patología y edad de los animales de los que proceden las muestras.

Los resultados obtenidos indican que el genotipo más frecuente en la Península Ibérica es el BVDV-1, aunque también se han identificado 3 casos del genotipo BVDV-2. En cuanto a los subgenotipos, el 1b es el más extendido pero también se han descrito infecciones por 1a, 1e, 1f, 2b y 2c. Asimismo, se ha determinado que un caso de *Pestivirus* en bovino estuvo ocasionado por BDV-4. Por otro lado, cabe destacar que, en los animales de los que proceden las muestras evaluadas, las patologías respiratorias fueron las más frecuentes y un gran porcentaje de los animales tenía más de 45 días de edad.

ABSTRACT

The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is the causative agent of bovine viral diarrhoea (BVD), an endemic disease that causes significant economic losses to the livestock industry worldwide. There are two different genotypes of BVD virus (BVDV-1 and BVDV-2) which, in turn, have been divided into numerous subtypes after being phylogenetically evaluated.

The identification of the circulating genotypes of BVDV in a country or region is of great importance because it provides epidemiological information that helps to improve the control and eradication programs of this agent.

In this Master's thesis, it was determined the genotype of BVDV present in samples from 119 clinical cases of bovine positives to *Pestivirus*. The evaluated cases come from different herds of the Iberian Peninsula and have been received by the Exopol laboratory during the years 2015-2019. In addition, a phylogenetic analysis of the 5'UTR region of these viruses was carried out to identify the circulating BVDV subgenotypes. Furthermore, it was determined the age and type of pathology of the animals from which the evaluated samples come.

The results indicate that the most frequent genotype in the Iberian Peninsula is BVDV-1, although 3 cases of the BVDV-2 genotype have also been identified. Regarding the subgenotypes, 1b is the most widespread but infections by 1a, 1e, 1f, 2b and 2c have also been described. Additionally, it has been determined that one of the evaluated cases is infected with BDV-4. Furthermore, it has been established that the most frequent pathology in the animals from which the samples come is of a respiratory nature and a large percentage of the animals are more than 45 days old.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 *Pestivirus*

Los *Pestivirus* son un grupo de virus con envoltura y RNA monocatenario de polaridad positiva que infectan a mamíferos domésticos ocasionando importantes pérdidas económicas en la industria ganadera de muchos países en el mundo. Además, también han sido detectados en un amplio rango de especies de animales de vida salvaje entre los que se encuentran los jabalíes y los ciervos [1, 2].

Inicialmente, el género *Pestivirus* fue erróneamente clasificado dentro de la familia *Togaviridae*. No obstante, la determinación de la secuencia del genoma y de las zonas del mismo en las que se encuentran codificadas las proteínas virales, puso de manifiesto que los virus de la familia *Togaviridae* y los *Pestivirus* presentan importantes diferencias en la organización del genoma y la expresión génica. Por esta razón, el género *Pestivirus* se trasladó a la familia *Flaviviridae* donde reside actualmente [3].

El género *Pestivirus* ha comprendido, tradicionalmente, cuatro especies que incluyen al virus de la peste porcina clásica (*Classical Swine Fever Virus*, CSFV), el virus de la enfermedad de la frontera (*Border Disease Virus*, BDV) y el virus de la diarrea viral bovina, tipos 1 y 2 (*Bovine Viral Diarrhea Virus*, BVDV-1 y BVDV-2). La primera enfermedad descrita causada por *Pestivirus* data de 1833, año en que se reportó un caso de peste porcina clásica. Años más tarde, se describió ganado bovino afectado por diarrea viral bovina en 1946 y posteriormente ganado ovino afectado por la enfermedad de la frontera en 1959. Sin embargo, los *Pestivirus* no se consideraron un grupo de virus relacionados

hasta que se observó en estudios serológicos que se producía reactividad cruzada entre los agentes causales de la peste porcina clásica y la diarrea viral bovina [3].

La peste porcina clásica afecta a miembros de la familia *Suidae* y se considera una gran amenaza para la producción porcina a nivel mundial. Se trata de una enfermedad multisistémica severa que presenta un cuadro clínico muy variable. En función de las características tanto del virus como del hospedador, la enfermedad se puede manifestar de formas muy diversas que van desde una infección subclínica hasta fiebres hemorrágicas con alta mortalidad. Debido a su impacto en la salud animal y la industria porcina, así como su potencial para causar brotes transfronterizos, los casos detectados de peste porcina clásica se deben notificar obligatoriamente a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) [1, 4].

La enfermedad de la frontera, afecta principalmente al ganado ovino, aunque también se ha descrito en ganado caprino, y tiene un alto impacto económico. Como consecuencia de la infección de hembras durante los primeros meses de gestación, el cordero puede nacer muerto, con malformaciones o persistentemente infectado (PI). Por el contrario, las infecciones post-natales de ovejas inmunocompetentes suelen conllevar la manifestación de la enfermedad de una forma más leve o incluso inaparente [1].

La diarrea viral bovina (BVD) es endémica en el ganado bovino a nivel mundial y ocasiona pérdidas económicas muy elevadas [3]. Al igual que la peste porcina clásica, los casos detectados de diarrea viral bovina se deben notificar obligatoriamente a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Existen dos genotipos diferentes de virus de BVD (BVDV-1 y BVDV-2) los cuales, a su vez, han sido divididos en numerosos subtipos tras haber sido evaluados filogenéticamente [1, 5]. En los siguientes apartados del presente trabajo, se tratará en mayor profundidad diversos aspectos relacionados con el agente causal de esta patología.

Por otro lado, cabe destacar que en 2017 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) renombró las especies BVDV-1, BVDV-2, CSFV y BDV como Pestivirus A, B, C y D, respectivamente. Además, dicho comité ha añadido siete nuevas especies de *Pestivirus* atípicos conocidas como Pronghorn (Pestivirus E), Bungowannah (Pestivirus F), Giraffe (Pestivirus G), Hobi-like o BVDV-3 (Pestivirus H), Aydin (Pestivirus I), Pestivirus J y Pestivirus Porcino Atípico (Pestivirus K) [1, 6].

El *Pestivirus* Hobi-like ha cobrado importancia recientemente por su capacidad de infectar rumiantes y fue identificado por primera vez en un lote de suero fetal bovino (SFB) importado de Brasil; desde entonces se han reportado múltiples contaminaciones por este agente en SFB, cultivos celulares y también infecciones naturales en búfalos así como en ganado bovino [7]. Puesto que las vacas infectadas por Hobi-like presentan un cuadro clínico similar a la infección de estos animales por

diarrea viral bovina, muchos autores se refieren a los Hobi-like como BVDV-3. No obstante, los *Pestivirus* Hobi-like presentan diferencias genéticas con respecto a BVDV-1 y BVDV-2. Además, los métodos diagnósticos y vacunas que permiten detectar y controlar las dos especies de BVDV con éxito, no han demostrado ser tan efectivos para Hobi-like [8].

2.2 Virus de la diarrea viral bovina

El virus de la diarrea viral bovina es un patógeno que afecta principalmente al ganado bovino y, puesto que su distribución es mundial, ocasiona un alto impacto en la economía de numerosos países. Asimismo, las infecciones por BVDV también han sido descritas en otras especies de animales domésticos y salvajes entre los que se encuentran ovejas, cabras, cerdos, renos, búfalos, bisontes y alpacas [9].

El BVDV-1 se diagnosticó por primera vez en Estados Unidos en 1946 mientras que el BVDV-2 no fue identificado hasta el año 1993 en Canadá. Actualmente, el BVDV-1 se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo y, como se muestra en la **Figura 1**, representa el 90% de los aislamientos de este virus en Europa. Por el contrario, la mayoría de los aislamientos de BVDV-2 se han producido en América del Norte y los casos puntualmente descritos de este agente en otros continentes suelen deberse, casi en su totalidad, a infecciones por vacunas preparadas con SFB contaminado con BVDV-2 [10-12].

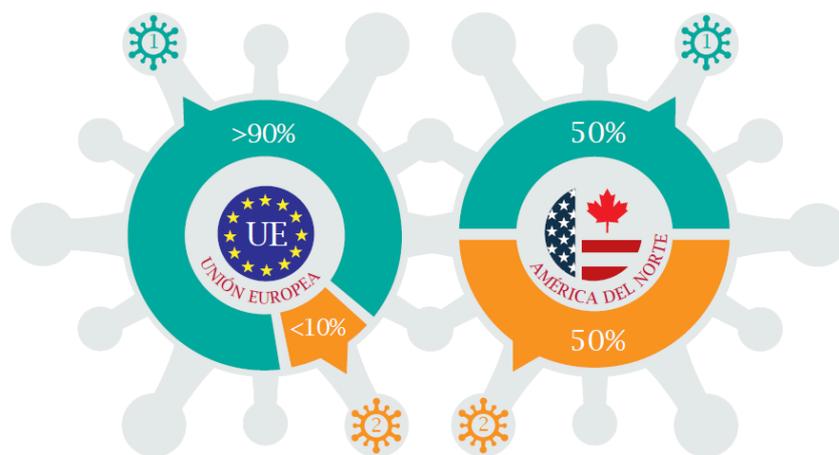


Figura 1. Prevalencia de BVDV, tipos 1 y 2. Imagen tomada de BVDzero (2019) [12].

El análisis genómico del virus de BVD ha permitido establecer veintiún subgenotipos de BVDV-1 (BVDV-1, a-u) y cuatro subgenotipos de BVDV-2 (BVDV-2, a-d) [9]. Por otro lado, estudios basados en los efectos del virus en cultivos de células epiteliales ha permitido diferenciar dos biotipos, citopático (CP) y no citopático (NCP) (**Figura 2**). Un tercer biotipo, denominado linfocitopático, ha sido propuesto tras observarse que produce muerte celular en células linfoides pero no epiteliales [13, 14].

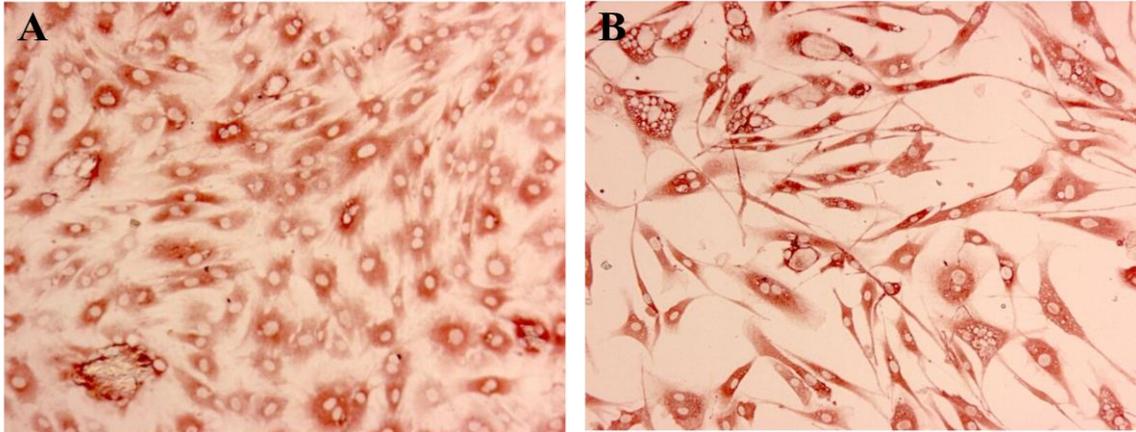


Figura 2. Biotipos de BVDV: A) No citopático B) Citopático. Imagen tomada del Institute of Veterinary Virology, University of Bern (2019) [14].

Mientras que el biotipo citopático desencadena un mecanismo apoptótico que produce la vacuolización del citoplasma y la muerte celular, los virus no citopáticos inhiben la producción de IFN de tipo I y se replican en la célula huésped sin producir daños detectables y sin reducir de manera considerable la viabilidad celular o las tasas de crecimiento [3, 15]. Se ha descrito que los virus citopáticos provienen de cepas no citopáticas que han sufrido diversas mutaciones (duplicación, inserción de RNA mensajero celular y mutaciones puntuales) en la región del RNA viral que codifica para la proteína NS2/3. Como consecuencia, las cepas no citopáticas expresan NS2-3 como una única proteína y las cepas citopáticas expresan dos proteínas distintas, NS2 y NS3, siendo esta escisión la que confiere al biotipo citopático la capacidad de matar a la célula infectada [15-17].

Cabe destacar que cuando el biotipo no citopático infecta a un animal durante los primeros meses de gestación, puede dar lugar al nacimiento de animales que se conocen como persistentemente infectados (PI), los cuales cumplen un rol crucial en la diseminación de este agente en el rebaño afectado y son propensos a desarrollar la enfermedad de las mucosas (EM) [18]. En el apartado 2.6 del presente trabajo se hablará de forma más detallada sobre los animales PI y la EM.

2.3 Morfología del virión

El virus de la diarrea viral bovina mide entre 40 y 60 nm de diámetro. Las partículas virales están formadas por una hebra de RNA de polaridad positiva cubierta por una cápside icosaédrica de naturaleza proteica (C) y una envoltura lipídica externa en cuya superficie se encuentran ancladas tres glicoproteínas codificadas por el genoma viral (E^{ms} , E1 y E2) (Figura 3). La inactivación del virus BVDV es relativamente sencilla puesto que la bicapa lipídica de la envoltura confiere al virión sensibilidad al calor, detergentes y otros solventes orgánicos [16].

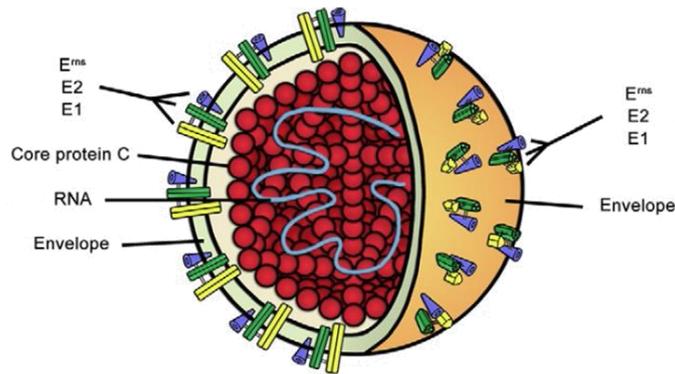


Figura 3. Morfología del virión de BVDV. Imagen modificada de Tautz, N., B.A. Tews, and G. Meyers (2015) [3].

2.4 Genoma viral

El genoma de la diarrea viral bovina consiste en una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva y un tamaño aproximado de 12,3 Kb en cepas no citopáticas. La longitud exacta del material genético no puede ser calculada con precisión puesto que es dependiente de cada cepa y, especialmente en aquellas de biotipo citopático, puede variar en gran medida debido a duplicaciones e inserciones del RNA celular del huésped [3, 16].

El genoma no está poliadenilado en 3' ni consta de caperuza o Cap en el extremo 5' [16, 19]. Contiene un único marco de lectura abierto (*Open Reading Frame*, ORF) que codifica para una poliproteína, de aproximadamente 4000 aminoácidos, y se encuentra flanqueado por dos regiones no codificantes (*Untranslated Regions*, UTR) denominadas 5' UTR y 3' UTR. Ambos UTR se pliegan en una estructura secundaria que les permite interactuar entre ellos mismos así como con proteínas virales y celulares [16, 20-22].

2.4.1 Regiones no codificantes

La región 5' UTR es la más conservada del genoma de los *Pestivirus*. Tiene un tamaño aproximado de 300-400 pb y se pliega dando lugar a una estructura secundaria (Figura 4.A) que incluye un sitio interno de entrada al ribosoma (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES) [3, 23]. La estructura secundaria de la región 5' no codificante de los *Pestivirus* se divide en varias horquillas (Ia, Ib, II y III) con diferentes funciones. A las horquillas Ia y Ib se le atribuye un papel bifuncional ya que participan tanto en la iniciación de la traducción como en la replicación del RNA viral. En cuanto a las horquillas II y III, ambas forman parte del IRES. El sitio de inicio de la traducción se encuentra *downstream* de un pseudonudo formado por el bucle f del dominio III y el codón AUG localizado *upstream* de dicho dominio [3].

Cabe destacar que, puesto que se encuentra altamente conservada entre todos los miembros del género *Pestivirus*, la región 5' UTR se utiliza de manera frecuente para realizar estudios de evaluación filogenética del virus de la diarrea viral bovina ya que esta región no codificante permite diferenciar no solo los genotipos del virus (BVDV-1 o BVDV-2) sino también los subtipos del mismo (BVDV-1, a-u o BVDV-2, a-d) [24].

En cuanto a la región 3' UTR, aunque menos que la 5'UTR, también se encuentra conservada entre los miembros del género *Pestivirus* [25]. Tiene un tamaño aproximado de 200 pb y se divide en dos partes, una variable (3'V) y otra conservada (3'C) (**Figura 4.B**). El 3' UTR se pliega en tres horquillas (I, II y III) de manera que la horquilla III se encuentra inmediatamente después del codón de parada y la horquilla I es la más próxima al extremo 3' del RNA genómico [3].

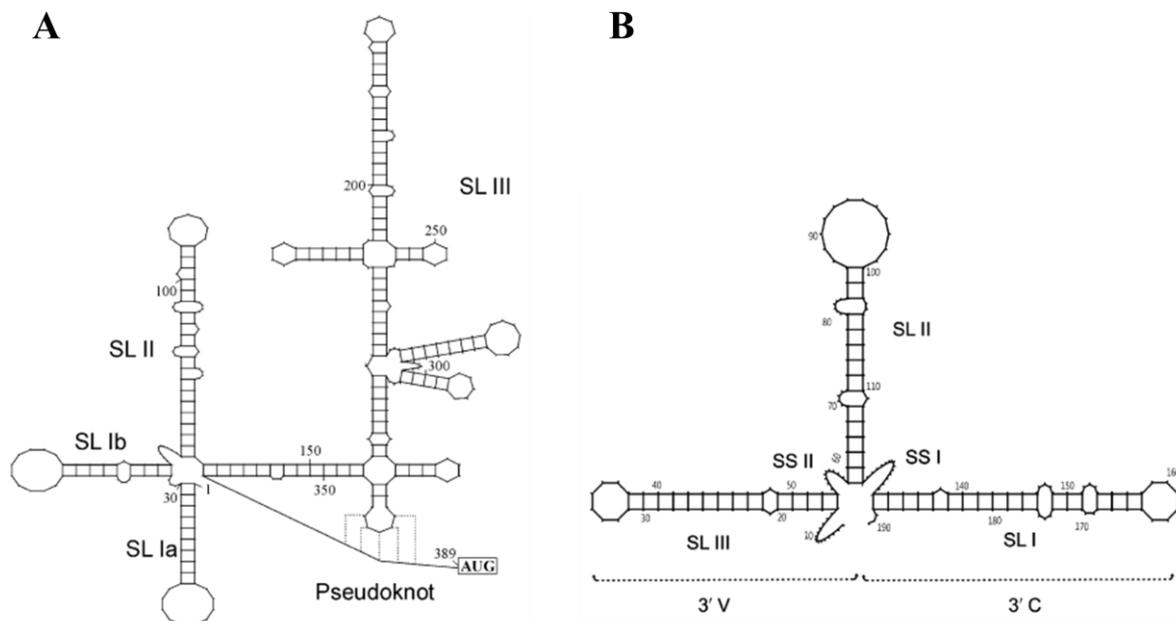


Figura 4. Representación de la estructura secundaria del extremo 5' UTR (A) y del extremo 3' UTR (B) del genoma de BVDV. Se muestran las horquillas (*Stem Loop*, SL) de ambas regiones UTR. Imagen tomada de Tautz, N., B.A. Tews, and G. Meyers (2015) [3].

2.4.2 Proteínas virales

El único ORF del genoma de BVDV codifica para una poliproteína que es posteriormente escindida por proteasas, tanto virales como celulares, para dar lugar a las diferentes proteínas virales las cuales, según su función, pueden ser estructurales o no estructurales. Las proteínas virales se encuentran codificadas en el siguiente orden: NH₂-N^{pro}-C-E^{ms}-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (**Figura 5**) [16].

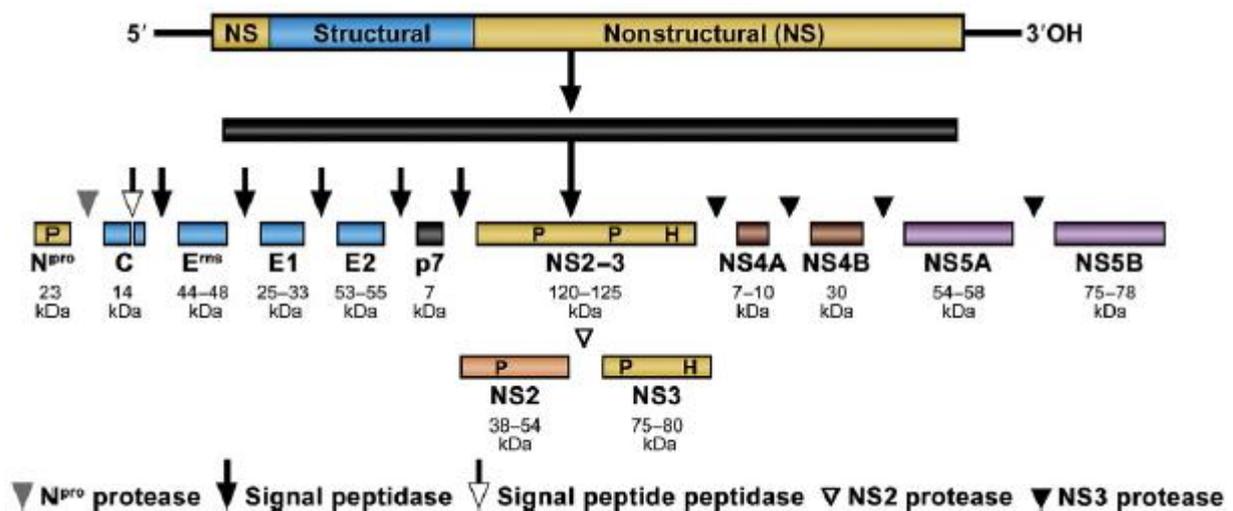


Figura 5. Organización genómica del BVDV. Imagen tomada de Tautz, N., B.A. Tews, and G. Meyers (2015) [3].

2.4.2.1 Proteínas estructurales

Las proteínas estructurales, conocidas como C, E^{ms}, E1 y E2, son aquellas que se encuentran en la partícula viral completa o virión, ya sea formando parte de la envoltura lipídica o constituyendo la nucleocápside [16].

La proteína C es la proteína viral más abundante y se localiza en el citoplasma de las células infectadas. Es la encargada de empaquetar el RNA genómico mediante la formación de la nucleocápside. Se localiza cerca del extremo amino terminal de la poliproteína y se genera mediante cortes de proteasas tanto virales como celulares [3, 26].

La glicoproteína E^{ms}, antiguamente denominada E0, es un homodímero con actividad RNasa que induce la generación de anticuerpos con poca capacidad neutralizante. Se localiza en la envuelta de las partículas virales pero también puede encontrarse en forma soluble tras ser secretada por células infectadas [3, 16].

Con respecto a las glicoproteínas E1 y E2, ambas son proteínas integrales de membrana que forman parte de la envuelta del virus. Se ha observado la formación de homodímero de E2 así como de heterodímeros de E1 y E2 siendo estos últimos indispensables para que las partículas virales sean infectivas. La función de E1 se desconoce. No obstante, en base a la función de dicha proteína en otros miembros de la familia *Flaviviridae*, se cree que la glicoproteína E1 de BVDV podría actuar de chaperona para E2. La interacción entre ambas glicoproteínas previene la activación prematura del dominio de fusión de membrana de E2. La proteína E2 es altamente inmunogénica e induce la formación de anticuerpos neutralizantes capaces de inhibir la infección de las células con el virus. Por

su parte, E1 no genera anticuerpos neutralizantes [3, 16, 27]. Cabe destacar que la proteína E2 se usa, aunque con menor frecuencia que 5' UTR, en estudios de genotipado de BVDV [24].

2.4.2.2 Proteínas no estructurales

A excepción de N^{pro}, que está codificada en el extremo 5' a la izquierda de las proteínas estructurales, el resto de proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) se encuentran codificadas, una detrás de otra, cerca del extremo 3' del genoma [16].

N^{pro} es una proteasa que, mediante un corte auto-proteolítico, es capaz de escindirse por sí misma de la poliproteína [16]. Se trata de una proteína única del género *Pestivirus* cuya función, en un principio, no se pensó que fuera más allá de realizar el corte en el genoma entre las regiones que codifican para N^{pro} y C. Sin embargo, posteriormente se ha observado que, *in vivo*, N^{pro} inhibe la producción de IFN de tipo I mediante la inducción de la degradación, por vía proteosomal, del IRF-3 [28, 29]. Por otro lado, cabe destacar que la proteína N^{pro} es utilizada también en estudios de genotipado de BVDV [24].

La proteína p7 es escindida por peptidasas señal de la célula hospedadora y es necesaria para que las partículas virales sean infecciosas. Sin embargo, esta escisión a veces puede producirse de forma ineficiente dando lugar a proteínas E2-p7 las cuales no son capaces de generar virus infectivos [3, 16].

NS2 y NS3 son las siguientes proteínas en ser escindidas. En células infectadas con virus no citopáticos estas proteínas se encuentran como una única, NS2-3, que debe ser escindida para permitir la replicación del RNA genómico. Dicha escisión es llevada a cabo por la proteína NS2 gracias a su actividad proteasa. Por el contrario, en células infectadas con virus citopáticos no se encuentra la proteína NS2-3 sino las proteínas NS2 y NS3. NS3 tiene, en N-terminal, un dominio serín proteasa que es esencial para la viabilidad del virus y es responsable de los cortes proteolíticos que permiten la liberación del polipéptido de NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. En cuanto al extremo C-terminal de NS3, tiene actividad NTPasa y consta de un dominio helicasa que participa en la replicación del genoma viral desenrollando el RNA [3, 16, 30].

La proteína NS4A funciona de cofactor para la actividad serín proteasa de NS3 [16]. Con respecto a NS4B, participa en la replicación del RNA así como en la reorganización de la membrana celular de las células infectadas por el virus [31].

Por último, en las células infectadas se puede encontrar la proteína NS5A-NS5B o bien las proteínas individuales NS5A y NS5B. En cuanto a NS5A, se ha observado que co-localiza con las proteínas NS4B y NS5B que forman el complejo de replicación del RNA del virus; no obstante, se desconoce su papel en la replicación del genoma viral [16, 31]. Por su parte, NS5B es una RNA

polimerasa dependiente de RNA y tiene un papel esencial tanto en la replicación del genoma del virus como en la morfogénesis de los viriones [3, 32].

2.5 Ciclo de replicación viral

El proceso de infección por BVDV comienza cuando los heterodímeros E1-E2, presentes en la envoltura viral, se unen a receptores específicos en la superficie de la célula diana [16]. Como consecuencia de esta interacción, los virus son endocitados mediante vesículas recubiertas de clatrina y el RNA genómico se libera en el citoplasma de la célula huésped donde es traducido a una poliproteína que será procesada para dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus. Una vez se dispone de las proteínas necesarias, la replicación del genoma vírico tiene lugar en factorías virales localizadas en la proximidad del retículo endoplasmático, siendo en este último orgánulo donde se produce el ensamblaje de las partículas virales. El virión es transportado a través de vesículas del aparato de Golgi hasta la membrana celular y es liberado al exterior mediante exocitosis [33-35].

2.6 Patogénesis

La infección por el BVDV puede ocasionar un amplio rango de manifestaciones clínicas que incluyen problemas respiratorios, digestivos y reproductivos entre otros; aunque también puede cursar con infecciones subclínicas [18].

En la infección aguda, causada generalmente por el biotipo no citopático de BVDV, las vías de entrada más habituales son la cavidad oro-nasal, la transmisión sexual o fenómenos de iatrogenia. Tras replicarse en las células epiteliales, el virus se dispersa por la sangre en una viremia transitoria. La infección aguda suele manifestarse, generalmente, de modo subclínico con sintomatología leve que comprende fiebre, disminución del apetito y diarrea entre otros. No obstante, puesto que el virus provoca leucopenia, linfopenia y trombocitopenia, los animales infectados pueden desarrollar enfermedades secundarias de carácter digestivo o respiratorio [36]. Con respecto a este último, cabe destacar el complejo respiratorio bovino (CRB), el cual genera elevadas pérdidas económicas y se basa en que la inmunosupresión causada por BVDV favorece la infección por otros virus y bacterias entre los que se encuentran Coronavirus bovino, Parainfluenza tipo 3, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida* o *Mannheimia haemolytica* entre otros [37].

A pesar de que se suele manifestar de modo subclínico, ocasionalmente la infección aguda puede presentar manifestaciones clínicas graves con cuadros hemorrágicos severos que afectan, principalmente, a las mucosas y a la piel y que ha sido denominado como enfermedad de las mucosas. Las manifestaciones clínicas graves provocan una alta mortalidad y, aunque no siempre, suelen estar causadas por cepas del genotipo BVDV-2 [36].

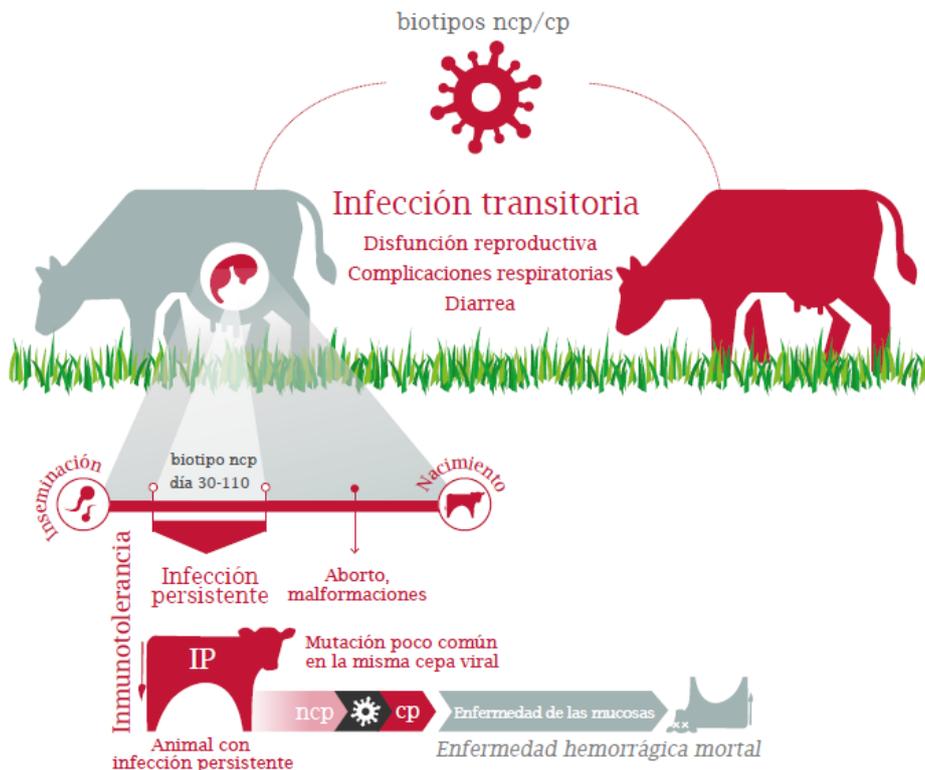


Figura 6. Infección transitoria y persistente por BVDV. Imagen tomada de BVDzero (2019) [12].

Por otro lado, el BVDV es capaz de atravesar la placenta y debido a esto, según la etapa de gestación en la que se encuentren las hembras infectadas con el virus, se pueden producir abortos, malformaciones en el feto o el desarrollo de animales persistentemente infectados. Los animales persistentemente infectados (PI) son consecuencia de la infección de la hembra en el primer trimestre de gestación con una cepa no citopática del virus (**Figura 6**). Como el sistema inmune del feto no se ha terminado de desarrollar, no reconoce al virus como agente extraño sino propio y se desarrolla inmunotolerancia frente a la cepa de BVDV infectante. Cuando nazcan, los animales PI serán un foco de infección capaz de distribuir viriones al resto del ganado a través de la leche, orina, saliva, semen, secreciones nasales, sangre y aerosoles. Aunque los animales persistentemente infectados pueden tener una apariencia sana, algunos de ellos nacen pequeños y débiles. Además, algunos animales con infección persistente muestran retraso en el crecimiento y problemas para ganar peso. La temperatura corporal así como la respiración y la frecuencia cardíaca de los animales PI se encuentran dentro de los rangos normales correspondientes con los de un animal sano; sin embargo, los niveles de la hormona tiroidea son significativamente menores [36, 38].

Es posible que los animales PI desarrollen la enfermedad de las mucosas, la cual se produce cuando un animal con infección persistente causada por una cepa no citopática del virus se superinfecta con una cepa citopática del mismo (**Figura 6**). Dicha cepa citopática puede originarse a partir de una mutación en la cepa no citopática que está causando la infección persistente o puede tratarse de una cepa proveniente de vacunas vivas. Las afecciones por la enfermedad de las mucosas

se manifiestan principalmente en el aparato digestivo [36, 39]. En las mucosas de la boca y las fosas nasales se forman úlceras que causan un babeo excesivo y catarro. Además, se desarrolla falta de apetito, diarrea, fiebre y, en última instancia, se produce la muerte del animal [40].

2.7 Diagnóstico

La detección específica y sensible del virus de BVD es crucial para llevar a cabo programas de control y erradicación eficientes en los rebaños afectados por esta enfermedad [38]. La identificación del BVDV se puede llevar a cabo mediante una gran diversidad de técnicas diagnósticas que incluyen el aislamiento viral, la detección del genoma, de antígenos virales o de anticuerpos específicos generados contra este virus [41].

El aislamiento viral en cultivo celular se ha considerado tradicionalmente el método *gold-standard* para la identificación de BVDV debido a su alta sensibilidad y especificidad. No obstante, se trata de una técnica cara y laboriosa por lo que su uso está restringido, mayoritariamente, a laboratorios de investigación. Una de las principales desventajas de este método reside en la necesidad de llevar a cabo un estricto control de las líneas celulares utilizadas para multiplicar los virus; así como de los lotes de suero fetal bovino utilizados para este fin. Considerando que la mayoría de cepas circulantes de BVDV son no citopáticas, las técnicas más utilizadas para descartar la presencia de *Pestivirus* en un cultivo celular han sido, por lo general, la inmunohistoquímica o la inmunofluorescencia [41, 42].

A día de hoy, aunque el aislamiento viral sigue siendo el método *gold-standard* y el recomendado por la OIE para el comercio internacional, en el diagnóstico rutinario las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) son el método más utilizado para la identificación de este agente [38, 41]. La técnica de RT-PCR se prefiere con respecto al aislamiento viral porque es más rápida, barata y sencilla de implementar en comparación con los cultivos celulares. Este método permite además identificar al BVDV en una gran variedad de muestras (sangre, leche, tejidos o heces entre otras) y con una sensibilidad que permite su uso incluso en muestras agrupadas en *pooles*. La evaluación de muestras agrupadas es una alternativa económica y muy útil cuando se necesita testar un gran número de animales con el fin de identificar animales PI [38]. El uso de la RT-PCR ha permitido también distinguir entre infecciones agudas y persistentes, mediante una segunda evaluación en el animal positivo y tras un intervalo mínimo de cuatro semanas; si el resultado de la segunda evaluación es negativo se trataría de una infección aguda mientras que si es positivo es muy probable que sea un animal PI [38]. Adicionalmente, el uso de ensayos de RT-PCR con cebadores específicos para amplificar la región 5' UTR ha permitido diferenciar con gran especificidad y sensibilidad, los genotipos 1 y 2 del virus BVDV [38, 41].

Además de las técnicas moleculares, el otro método usado habitualmente en el diagnóstico de rutina del BVDV son los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), los cuales permiten detectar antígenos virales o anticuerpos generados contra este agente. La detección de antígenos del virus de BVD mediante ELISA es un método rápido para la detección de animales persistentemente infectados. Se trata de una técnica robusta, simple y económica que permite analizar distintos tipos de muestras como suero, sangre, leche o cartílago auricular entre otros [38, 41].

En cuanto a la detección de anticuerpos específicos contra el virus, se utilizan dos tipos de ELISA, indirecto o de bloqueo. El ELISA indirecto detecta los anticuerpos generados contra antígenos inmunodominantes del virus como la glicoproteína E^{ns} (E0) en muestras de suero o leche; por tanto, esta técnica detecta los anticuerpos que desarrollan los animales infectados naturalmente y los anticuerpos que generan los animales vacunados con vacunas vivas atenuadas y vacunas inactivadas. Por el contrario, el ELISA de bloqueo detecta, únicamente, los anticuerpos generados contra la proteína no estructural NS3 de BVDV en muestras de suero o leche. Este tipo de ELISA se utiliza en programas de vigilancia de BVDV en explotaciones que no vacunan a los animales o que utilizan vacunas inactivadas, ya que los animales vacunados con vacunas inactivadas no generan anticuerpos anti-NS3. Por tanto, los animales que den positivo en el ELISA de bloqueo se habrán infectado con BVDV de manera natural y no como consecuencia de una vacuna [41, 42].

2.8 Repercusión económica y control de la enfermedad

La infección del ganado con BVDV supone un gran impacto en la economía a nivel mundial. Las pérdidas monetarias varían entre diferentes países así como entre las distintas regiones dentro de un mismo país. Principalmente, el impacto económico se debe a la reducción en la producción de leche, al bajo rendimiento reproductivo (abortos, malformaciones congénitas), al retraso en el crecimiento y al incremento de la morbilidad y mortalidad consecuencia de la inmunosupresión generada por la infección [43]. Pese a que no existen estudios que proporcionen datos precisos sobre las pérdidas económicas, se estima que, en España, los costes medios anuales por animal infectado rondan los 30-60€. Teniendo en cuenta la extensión de la ganadería bovina de nuestro país, las pérdidas económicas pueden elevarse a miles, sino millones, de euros. Es por ello que la implementación de programas de prevención y control es de suma importancia [44, 45].

En la actualidad, la mayor parte de los países europeos han establecido programas sanitarios con el objetivo de controlar o incluso erradicar la diarrea viral bovina. Según el país, varía tanto el enfoque de los programas sanitarios (dirigidos al control o a la erradicación) como el carácter del mismo (obligatorio o voluntario) [46].

Los países escandinavos (Noruega, Finlandia, Suecia y Dinamarca) optaron por implementar, al inicio de la década de los 90, programas de erradicación de BVDV basados en un análisis sistemático

sin vacunación. Dichos programas constan de tres etapas. La primera etapa consiste en evaluar el ganado para determinar si está, o no, infectado con el virus. Para ello, se cogen muestras (del tanque de leche o de suero) que sean representativas de todos los grupos epidemiológicos del ganado y se analizan mediante técnicas como ELISA para detectar anticuerpos contra el virus. La segunda etapa del programa de erradicación consiste en monitorizar el ganado no infectado repitiendo regularmente este tipo de análisis basado en la detección de anticuerpos. Por último, la tercera etapa del programa se basa en la identificación y erradicación de los animales PI, para lo cual se realiza un análisis inicial de todos los animales y un posterior seguimiento de los nacimientos de terneros así como de las hembras que fueron seronegativas en el screening inicial [47, 48].

Los programas de erradicación de BVDV escandinavos demostraron ser sumamente efectivos. Por ello, Austria decidió implementar en 1997 el modelo escandinavo de erradicación del virus siendo al principio voluntario pero, más tarde, de carácter obligatorio. Otros países que decidieron implementar programas obligatorios de erradicación de BVDV son Suiza (2008), Alemania (2011) e Irlanda (2011) [49].

No obstante, cabe destacar que hay países europeos como Francia, Italia, Portugal o España que no disponen de planes nacionales de control de BVDV. Algunas regiones de Francia (como la Bretaña) y de Italia (como Bolzano) llevan a cabo, desde 2001 y 2005 respectivamente, iniciativas voluntarias para identificar y eliminar los animales PI. Por su parte, las únicas medidas de control que se llevan a cabo en Portugal son las decididas por el dueño de cada ganadería, no existen programas de control regionales [49, 50].

En lo que respecta a España, desde la década de los 2000, algunas comunidades autónomas del norte del país tienen implementados programas voluntarios de control de BVDV. A pesar de encontrarse en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE, la diarrea viral bovina no está incluida en ningún programa nacional de erradicación. Actualmente, los programas sanitarios para el control de esta enfermedad son llevados a cabo mediante las agrupaciones de defensa sanitaria ganaderas (ADSG). Las ADSG, gracias a las subvenciones estatales (reguladas por el Real Decreto 784/2009) así como a las ayudas autonómicas, desarrollan programas de control y ayudan a reducir los costes veterinarios que suponen las pruebas diagnósticas y el resto de medidas necesarias para la detección y el control de la enfermedad. Los programas desarrollados por las ADSG constan de cuatro fases llevadas a cabo en el siguiente orden: detección de explotaciones con infección activa, identificación y eliminación de los animales persistentemente infectados, monitorización de las explotaciones y aplicación de medidas de bioseguridad [50, 51].

En la actualidad, Galicia, Castilla y León, Cantabria y Asturias son las únicas comunidades autónomas que tienen implementados los programas de control de BVDV desarrollados por las ADSG. Además, cabe destacar que dichos planes de control no se realizan de manera uniforme en

toda la comunidad puesto que, como se ha comentado anteriormente, son de carácter voluntario [50, 51].

Por otra parte, para poder desarrollar programas de control efectivos es de vital importancia conocer cuáles son los genotipos de BVDV circulantes. De esta manera, se facilitará el diseño de estrategias que permitan prevenir la enfermedad así como detectarla y erradicarla [46, 52].

Estudios previos realizados por distintas universidades o institutos de investigación españoles, han determinado que en nuestro país el genotipo 1 de BVDV es el más frecuente, siendo a su vez el subtipo 1b el más extendido; en cuanto al genotipo 2, aunque de forma puntual, también ha sido detectado. Sin embargo, cabe destacar que la mayoría de estos estudios presentan datos de animales procedentes principalmente de la zona norte del país y hasta el año 2015 [53-55]. En el caso de Portugal, se han realizado menos estudios que en España pero también se ha determinado que el genotipo BVDV-1b es el más extendido y se ha detectado algún caso de ganado afectado con el genotipo 2 [56].

3. OBJETIVOS

Considerando la información previa, en el presente trabajo se pretende realizar un estudio más detallado y actualizado del BVDV circulante en nuestro país. El objetivo general es la evaluación filogenética del virus de la diarrea viral bovina en animales infectados procedentes de rebaños de la Península Ibérica. Para ello, los objetivos concretos son:

1. Determinar el genotipo de BVDV, mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa a tiempo real (RT-qPCR), en casos clínicos (positivos a este agente) recibidos en el laboratorio Exopol durante los últimos cuatro años. Dichos casos clínicos proceden de diferentes provincias españolas y de Portugal.
2. Identificar los subgenotipos de BVDV circulantes mediante secuenciación y el análisis filogenético de la región 5'UTR.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Casos clínicos y muestras evaluadas

Para la realización de este trabajo se emplearon muestras de 119 casos clínicos positivos a *Pestivirus* evaluados por el laboratorio de diagnóstico veterinario Exopol y recibidos entre los años 2015 y 2019. El estudio realizado fue de tipo retrospectivo y descriptivo en función de la información recibida por parte del veterinario y/o ganadero en cada caso.

La procedencia de los casos es diversa y comprende explotaciones ganaderas de diferentes provincias españolas así como de distintos distritos de Portugal. Como se observa en la **Tabla 1**, las muestras de casos españoles (n=110) proceden de 11 comunidades autónomas diferentes y 25 provincias distintas. En cuanto a las muestras de Portugal (n=9), proceden de 3 distritos diferentes. En la **Tabla A1.1** del **Anexo I** se ofrece una información más detallada sobre el origen y la fecha de recepción de los casos.

Tabla 1. Procedencia de los casos clínicos positivos a *Pestivirus* evaluados en el presente estudio.

Casos clínicos procedentes de España			
<i>Comunidad Autónoma</i>	<i>Provincia</i>	<i>Nº total de casos por Provincia</i>	<i>Nº total de casos por Comunidad Autónoma</i>
Andalucía	Córdoba	1	3
	Sevilla	2	
Aragón	Huesca	6	25
	Zaragoza	19	
Cantabria	Cantabria	5	5
Castilla-La Mancha	Cuenca	1	5
	Toledo	4	
Castillas y León	Ávila	1	12
	Burgos	2	
	León	3	
	Salamanca	1	
	Segovia	1	
	Soria	2	
	Valladolid	2	
Cataluña	Barcelona	5	36
	Gerona	10	
	Lérida	19	
	Tarragona	2	
Comunidad de Madrid	Madrid	4	4
Comunidad Foral de Navarra	Navarra	6	6
Extremadura	Badajoz	1	5
	Cáceres	4	
Galicia	La Coruña	4	5
	Pontevedra	1	
Principado de Asturias	Asturias	4	4
Casos clínicos procedentes de Portugal			
<i>Distrito</i>	<i>Nº total de casos</i>		
Évora	4		
Lisboa	1		
Oporto	4		

Por otro lado, los casos clínicos fueron clasificados en dos grupos según la edad de los animales de los que procedían. El primer grupo se corresponde con las muestras procedentes de animales de más de 45 días (n=52) y el segundo grupo con las muestras procedentes de animales menores de 45 días (n=24); la razón por la cual se hizo esta división se explicará más adelante, en el apartado 5.1 de resultados y discusión. Por otra parte, varias muestras procedieron de fetos (n=9) y para un número

considerable de muestras se desconoce la edad del animal del que proceden (n=34) ([Tabla A1.2 del Anexo I](#)).

En cuanto a la patología observada en los casos clínicos ([Tabla A1.2 del Anexo I](#)), estas fueron principalmente de tipo respiratorio (n=59), digestivo (n=33), reproductivo (n=3) y abortos (n=9). Un número reducido de casos incluyeron otras causas (n=15). Según cada patología, se procesó un determinado tipo de muestra siendo los pulmones (n=29) y lavados (n=21) los más frecuentes. Sin embargo, también se trabajó con hisopos (n=11), heces (n=11), intestinos delgados (n=10) y otras muestras (n=37). Por otra parte, cabe destacar que las muestras fueron evaluadas de forma individual (n=47) o agrupadas en *pools* (n=72); siendo las muestras en *pool* una mezcla de órganos del mismo tipo o una mezcla de órganos de distintos tipos ([Tabla A1.3 del Anexo I](#)).

4.2 Extracción del RNA viral y determinación de la infección por *Pestivirus*

Las muestras fueron recibidas por el laboratorio Exopol en el área destinada a necropsias donde se les asignó un número de caso y, en aquellas muestras en las que fue necesario, se llevó a cabo un procesamiento de la misma. Los materiales biológicos como sangre, suero, leche, hisopos y lavados no necesitaron ningún tipo de procesamiento mientras que en los órganos y tejidos se seleccionaron las partes más relevantes considerando los agentes patógenos a evaluar.

Una vez obtenido el material biológico, este fue transferido al área de extracción de ácidos nucleicos donde se realizó un pretratamiento (que varía en función del tipo de muestra) con el fin de normalizar y automatizar la extracción del RNA en muestras de origen diverso. Una vez procesadas en esta área, las muestras se almacenaron en congelación (-20°C) para su posterior uso en caso de ser necesario.

La extracción de ácidos nucleicos fue realizada utilizando un robot automático de extracción KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific) y el respectivo kit MagMAX CORE™ Nucleic Acid Purification (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. El método de extracción está basado en la tecnología de perlas magnéticas, que consiste en que el DNA/RNA de las muestras se adhiere a las perlas y estas, a su vez, se pegan a un imán del robot que transfiere las perlas con el material genético a varias placas con tampones de lisado/lavado. Tras la última etapa de lavado, el material genético extraído se dispensa en tubos eppendorf correctamente rotulados con el número de registro de cada muestra.

Posteriormente, las muestras de ácidos nucleicos se transfirieron al área de amplificación donde se realizó una RT-qPCR usando el kit comercial EXOone BVDV-BDV oneMIX (Exopol) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit está validado para la identificación de BVDV-1, BVDV-2, BDV, y Hobi-like [57]; y contiene todos los reactivos necesarios para la realización de la RT-qPCR,

incluido un control positivo liofilizado (PEST). Las enzimas (Taq DNA polimerasa, transcriptasa reversa), el buffer de reacción y los cebadores marcados con sondas TaqMan para la identificación de *Pestivirus* (FAM) así como para un control endógeno (HEX), vienen incluidos en un solo tubo (oneMIX). El ensayo usa como diana una zona de la región 5'UTR que se encuentra conservada entre los virus BVDV-1, BVDV-2, BDV y Hobi-like pertenecientes al género *Pestivirus*. El protocolo térmico utilizado se muestra en la **Tabla 2**.

En el presente trabajo fin de máster se utilizaron un total de 119 casos clínicos evaluados durante los años 2015-2019 y que tuvieron resultado positivo a *Pestivirus* con este ensayo. El valor del ciclo umbral (Cq) obtenido en cada muestra mediante la técnica de RT-qPCR se detalla en la **Tabla A1.2** del **Anexo I**.

Tabla 2. Protocolo térmico utilizado en la RT-qPCR del ensayo general de *Pestivirus*.

Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Etapas
1	45	15 min	Retrotranscripción del RNA a cDNA
1	95	5 min	Activación Taq DNA polimerasa
40	95	15 seg	Desnaturalización del DNA
	60	1 min	Hibridación cebadores/Lectura de la fluorescencia

4.3 Determinación del genotipo de BVDV mediante RT-qPCR

Para determinar el genotipo de *Pestivirus* presente en las 119 muestras se utilizaron dos ensayos de RT-qPCR específicos para BVDV-1 (EXOone BVDV 1 oneMIX, Exopol) y BVDV-2 (EXOone BVDV 2 oneMIX, Exopol) previamente validados [57]. El formato de estos ensayos es similar al ensayo para la detección de *Pestivirus* mencionado en el apartado anterior.

Los cebadores del kit EXOone BVDV 1 y EXOone BVDV 2 están diseñados para que se hibriden a una zona de la región 5'UTR que se encuentra conservada y es específica para los virus del genotipo BVDV-1 y BVDV-2, respectivamente.

La realización de la RT-qPCR fue llevada a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. En primer lugar, se resuspendió de forma suave el contenido del tubo oneMix con la ayuda de un vortex y se dispensaron 15 µL por pocillo en placas de PCR. A continuación, tras agitar brevemente la muestra se añadieron 5 µL en su respectivo pocillo. El volumen final de reacción de la RT-qPCR fue de 20 µL y en cada carrera de amplificación se usaron un control positivo y un control negativo. En el pocillo de control negativo se añadieron 5 µL de tampón Tris-EDTA 1X (Sigma) mientras que en el pocillo de control positivo se añadieron 5 µL de PEST (previamente reconstituido en 250 µL de tampón Tris-EDTA 1X). Una vez dispensada, la placa fue sellada y, tras un pulso de centrifuga, se procedió a la amplificación del material genético en un termociclador MiniOpticon™ (BioRad). Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa BioRad CFX Manager 3.1 y las muestras con Cq

superior a 38 se consideraron negativas. El protocolo térmico utilizado fue el mismo para ambos ensayos y se describe en la [Tabla 3](#).

Tabla 3. Protocolo térmico utilizado en la RT-qPCR con los ensayos específicos para BVDV-1 y BVDV-2.

Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Etapa
1	45	15 min	Retrotranscripción del RNA a cDNA
1	95	5 min	Activación Taq DNA polimerasa
40	95	15 seg	Desnaturalización del DNA
	60	1 min	Hibridación cebadores/Lectura de la fluorescencia

4.4 Determinación del subgenotipo de BVDV mediante secuenciación

4.4.1 RT-PCR de la región 5'UTR

4.4.1.1 Amplificación de ácidos nucleicos

Para la determinación del subgenotipo de BVDV, se procedió a amplificar la región 5'UTR utilizando los cebadores B_E (directo) y B₂ (reverso) descritos en el protocolo de Letellier [58]. Dichos cebadores ([Tabla 4](#)), están diseñados de manera que se unen y amplifican una zona de, aproximadamente, 287 pares de bases (pb) de la región 5'UTR que se encuentra conservada entre los virus BVDV-1, BVDV-2, BDV y CSFV del género *Pestivirus*. Los cebadores fueron sintetizados por la casa comercial Integrated DNA Technologies.

Tabla 4. Cebadores utilizados en el ensayo de RT-PCR.

Cebador	Secuencia 5'→3'	Posición en el genoma	Tamaño del producto amplificado (pb)
B _E (fw)	CATGCCCTTAGTAGGACTAGC	108-127	287
B ₂ (rv)	TCAACTCCATGTGCCATGTAC	395-375	

La RT-PCR fue realizada utilizando el kit SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step (Bioline), el cual contenía una Master Mix SensiFAST™ (2X), enzima transcriptasa reversa, inhibidor de RNasas y agua libre de nucleasas. Para llevar a cabo la RT-PCR se añadieron, en placas de 48 pocillos, 35 µL por pocillo de una mezcla de reactivos que contenía 25 µL de Master Mix SensiFAST™ (2X), 1 µL de inhibidor de RNasas, 0,5 µL de transcriptasa reversa, 0,5 µL de agua molecular libre de DNasas y RNasas, 4 µL de cebador directo B_E y 4 µL de cebador reverso B₂. La concentración final de los cebadores fue 800 nM. A continuación, se añadieron 15 µL del RNA de la muestra por pocillo obteniendo, así, un volumen de reacción de 50 µL por pocillo. Tras sellar la placa y darle un pulso de centrifuga, se procedió a la amplificación usando un termociclador MiniOpticon™ (BioRad). El protocolo térmico utilizado se muestra en la [Tabla 5](#). La temperatura de annealing se varió entre 55 y 60°C dependiendo del valor del C_q obtenido en el ensayo general de *Pestivirus* en cada muestra; de

manera que, para amplificar muestras con valores Cq altos (≥ 32), se utilizaron temperaturas de annealing bajas (55°C).

Cabe destacar que la manipulación de los reactivos y de las muestras se llevó a cabo en espacios físicamente separados para reducir al máximo la posibilidad de contaminaciones.

Tabla 5. Protocolo térmico utilizado en la RT-PCR.

Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Etapa
1	45	15 min	Retrotranscripción del RNA a cDNA
1	95	5 min	Activación Taq DNA polimerasa
40	95	15 seg	Desnaturalización del DNA
	55-60	1 min	Hibridación cebadores
	72	15 seg	Elongación de la cadena

4.4.1.2 Visualización de los productos de amplificación

La visualización de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Los geles de agarosa (Ibiam Technologies) fueron preparados al 2% con tampón Tris-acetato-EDTA 1X (Formedium) y se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL, Sigma). Tras insertar los geles en la cubeta de electroforesis se añadió tampón Tris-acetato-EDTA 1X y se cargaron, por carril, los 12 μ L resultantes de mezclar 10 μ L de producto amplificado con 2 μ L de tampón de carga 5X (Ibiam Technologies). El tampón de carga contenía azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% y Ficoll 15%. El marcador de peso molecular utilizado fue 100 bp DNA Ladder Ready-to-use (Ibiam Technologies). La electroforesis se realizó a 100 V durante 25 minutos y, una vez terminada, se procedió a la visualización de los geles colocándolos en un equipo transiluminador (E-box, Vilber). Si el producto amplificado presentaba un tamaño de 300 pb, la muestra se consideraba positiva y se guardaba el amplicón para enviar a secuenciar.

4.4.2 Purificación de cDNA a partir de gel de agarosa

En aquellas muestras en las que se obtuvo el producto de amplificación deseado pero se observaron también otras bandas adicionales de mayor intensidad, se procedió a realizar una purificación a partir del gel de agarosa utilizando el kit DNA Gel Extraction (Norgen Biotek Corporation) según las instrucciones del fabricante. La banda de interés fue escindida utilizando un bisturí estéril y el fragmento cortado fue introducido en un eppendorf estéril para determinar su peso. A continuación, se añadieron 3 volúmenes del reactivo Binding Buffer G por cada volumen de gel y se incubó durante 10 minutos a 55°C agitando el eppendorf en un vortex cada 2-3 minutos para ayudar a la completa disolución del gel. Una vez disuelto el gel, se añadió un volumen de isopropanol frío por cada volumen de gel, se mezcló por pipeteo y se procedió a pasar la muestra a través de la columna provista por el kit. Para ello, se añadieron 750 μ L de muestra sobre la columna, se centrifugó

durante un minuto a 8000 rpm y se descartó el filtrado. Este paso fue repetido hasta que se hubo filtrado toda la muestra.

Para lavar el DNA retenido en la columna, se añadieron 500 μ L de Wash Solution A y se centrifugó un minuto a 14000 rpm. Tras descartar el filtrado, se centrifugó nuevamente durante 2 minutos a 14000 rpm para secar bien la columna. A continuación, se añadieron 30 μ L de Elution Buffer B en el centro del filtro y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm, se descartó la columna y se guardó el cDNA contenido en el volumen filtrado.

4.4.3 Cuantificación del cDNA purificado a partir del gel de agarosa

La cuantificación del cDNA purificado se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 260 nm con ayuda del espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare).

4.4.4 Clonación de cDNA en el vector pGEM-T

En aquellos casos clínicos en los que la muestra resultó positiva a ambos ensayos de RT-qPCR específicos para los genotipos BVDV-1 y BVDV-2, se procedió a clonar el producto purificado a partir del gel de agarosa en el vector pGEM-T. Para ello, se realizó la ligación del inserto con el vector, se transformaron células competentes con el producto de ligación y, por último, se comprobó la correcta incorporación del inserto mediante PCR.

4.4.4.1 Ligación

Para realizar la ligación del cDNA y del vector pGEM-T (Promega) se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Promega). Se preparó un volumen de reacción de 5 μ L con una relación inserto/vector de 2:1. Para ello, se mezclaron 1 μ L del vector pGEM-T, 2 μ L de cDNA, 1 μ L de enzima T4 DNA ligasa, 0,5 μ L de buffer de ligación 10X (300 mM Tris-HCl, pH 7,8; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 10 mM ATP; Promega) y 0,5 μ L de agua miliQ. Una vez preparada, la mezcla se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente.

El mapa del vector pGEM-T se encuentra recogido en la [Figura A2.1](#) del [Anexo II](#).

4.4.4.2 Transformación de *E. coli* mediante choque térmico

La transformación de células competentes *E. coli* DH5 α con el producto de ligación se llevó a cabo mediante choque térmico.

En primer lugar, se descongelaron las células competentes introduciéndolas en hielo durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 2 μ L de la mezcla de ligación sobre las células competentes y

se incubaron durante 30 minutos en hielo. Tras incubar, con ayuda de un termobloque se aplicó un choque térmico de un minuto a 42°C y luego se incubaron en hielo durante 2 minutos. Una vez realizado el choque térmico, se añadieron a las células 800 µL de medio LB sin antibiótico y se incubaron durante 90 minutos a 37°C con agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se sembraron 100 µL de células en placas de LB agar con ampicilina. Las células competentes restantes se centrifugaron durante 5 minutos a 8000 rpm, se descartó el sobrenadante volcando el eppendorf y, tras resuspender el pellet en el volumen de medio LB restante, se sembró en placas de LB agar con ampicilina. Las placas se incubaron durante 24-48 horas a 37°C.

4.4.4.3 Comprobación de la incorporación del inserto mediante PCR

Para comprobar la correcta incorporación del inserto en el vector pGEM-T, se realizó un screening de las bacterias transformadas. Para ello, se seleccionaron 12 de las colonias que crecieron en la placa de LB agar con ampicilina y se procedió a extraer el ácido nucleico por choque térmico en un termobloque durante 10 minutos a 95°C; después, se centrifugaron durante 5 minutos a 13000 rpm y, finalmente, se pasó el sobrenadante a tubos eppendorf limpios.

Una vez extraído el DNA, se realizó una PCR convencional para amplificar la región del vector en la que debería haberse incorporado el inserto. Para ello, se utilizaron los cebadores T7 directo y M13 reverso mostrados en la [Tabla 6](#) y encargados a la casa comercial Integrated DNA Technologies. Los sitios de hibridación con el vector se detallan en la [Figura A2.2](#) del [Anexo II](#) y en la [Tabla A2](#) del [Anexo II](#). Para llevar a cabo la reacción, se preparó una mezcla de 20 µL añadiendo 10 µL de Master Mix SensiFAST™ (2X) (SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step, Bioline), 3 µL de agua molecular libre de DNasas y RNasas (Sigma), 1 µL de cebador directo T7 (concentración final de 500 nM), 1 µL de cebador reverso M13 (concentración final de 500 nM) y 5 µL del DNA de las células extraído mediante el choque térmico. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador MiniOpticon™ (BioRad). El protocolo térmico utilizado se muestra en la [Tabla 7](#).

Una vez terminada la PCR, la visualización de los productos de amplificación se realizó tal y como se indica en el apartado 4.4.1.2 del presente trabajo.

Tabla 6. Cebadores utilizados en el ensayo de PCR.

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Posición en el vector
T7 (fw)	TAATACGACTCACTATAGGG	2984-3
M13 (rv)	CAGGAAACAGCTATGAC	161-177

Tabla 7. Protocolo térmico utilizado en la PCR.

Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Etapa
1	95	5 min	Activación Taq DNA polimerasa
40	95	15 seg	Desnaturalización del DNA
	55	1 min	Hibridación cebadores
	72	15 seg	Elongación de la cadena

4.4.5 Secuenciación de Sanger

La secuenciación de los productos amplificados fue realizada mediante el método de Sanger utilizando un equipo secuenciador de DNA 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), el servicio fue prestado por la empresa STAB VIDA. Las muestras fueron enviadas a secuenciar en ambos sentidos usando los cebadores B_E y B₂ (ver secuencia de los cebadores en la [Tabla 4](#), apartado 4.4.1.1).

4.4.5.1 Obtención de las secuencias 5'UTR

Los datos de secuencia cruda de cada caso fueron evaluados haciendo uso de varias herramientas bioinformáticas de acceso libre en internet. En primer lugar, se procedió a revisar y realizar un alineamiento genético de las secuencias obtenidas con el cebador directo y el cebador reverso con el fin de obtener una secuencia consenso de cada caso; para ello se utilizaron los softwares Chromas 2.6.6 y MAFFT 7 [59] para visualizar y alinear, respectivamente. Posteriormente, la secuencia consenso fue introducida en la herramienta BLASTn [60] con el fin de buscar secuencias homólogas en esta base de datos y así poder determinar el subgenotipo del virus BVDV presente en cada una de las muestras analizadas.

Adicionalmente, se utilizó el programa LALIGN [61] para determinar el porcentaje de similitud entre dos secuencias nucleotídicas y el programa SDT v 1.2 para elaborar una matriz de similitudes entre las secuencias estudiadas.

4.4.6 Análisis filogenético

4.4.6.1 Búsqueda de secuencias de referencia

Para elaborar los árboles filogenéticos se procedió a realizar una revisión bibliográfica con el fin de identificar y seleccionar las cepas de referencia de cada genotipo de BVDV (BVDV-1, BVDV-2), así como de BDV, más usadas en este tipo de estudios [62-82]. Las secuencias de la región 5'UTR de las cepas de referencia de *Pestivirus* seleccionadas fueron obtenidas de la base de datos GenBank [83] y se muestran en la [Tabla 8](#).

Tabla 8. Secuencias de la región 5'UTR de cepas de referencia de *Pestivirus* utilizadas en la elaboración de los árboles filogenéticos.

	Genotipo	Nº acceso GenBank	Región Geográfica	Referencia
BVDV-1				
NADL	BVDV-1a	M31182	EE.UU.	[62]
Osloss	BVDV-1b	M96687	Desconocida	[63]
P	BVDV-1b	AF298070	Austria	[64]
7548	BVDV-1b	U65062	Suecia	[65]
60-GB/11	BVDV-1b	JN715047	Polonia	[66]
MS14	BVDV-1b	GU395535	EE.UU.	[67]
10-84	BVDV-1e	AF298054	Francia	[64]
J	BVDV-1f	AF298067	Austria	[64]
BVDV-2				
890	BVDV-2a	U18059	EE.UU.	[68]
Lees	BVDV-2a	U65051	Desconocida	[65]
11/Mi/97	BVDV-2a	AJ293603	Italia	[69]
NY93	BVDV-2a	AF039173	EE.UU.	[70]
34B	BVDV-2b	AF244952	Argentina	[71]
nep7	BVDV-2b	AY443026	Argentina	No publicado
Soldan	BVDV-2b	U94914	Brasil	No publicado
SE6444	BVDV-2c	Z79777	Alemania	No publicado
NRW12-13	BVDV-2c	HG426483	Alemania	[72]
BDV				
X818	BDV-1	AF037405	Alemania	[73]
BD31	BDV-1	U70263	EE.UU.	[74]
Reindeer-1	BDV-2	AF144618	Alemania	[75]
Rudolph	BDV-2	AB122086	Japón	No publicado
Gifhorn	BDV-3	GQ902940	Dinamarca	[76]
297	BDV-3	KC484999	Eslovaquia	[77]
Chamois-1	BDV-4	GU270877	Andorra	[78]
Aveyron	BDV-5	KF918753	Francia	[79]
F-5415	BDV-5	EF693988	Francia	[80]
F-7014	BDV-6	EF693993	Francia	[80]
F-0299/477	BDV-6	EF694003	Francia	[80]
Aydin/04-TR	BDV-7	JX428945	Turquía	[81]
103761	BDV-8	KT072634	Italia	[82]

4.4.6.2 Construcción de árboles filogenéticos

En primer lugar, se utilizó el programa ClustalW 2.1 [84] para realizar un alineamiento múltiple de las secuencias de referencia y las secuencias objeto de estudio. Una vez hecho el alineamiento, se compactó mediante el programa Gblocks [85] y, haciendo uso del software MAFFT 7 [59], se procedió a la construcción del árbol filogenético utilizando el método Neighbor-joining y un número de repeticiones bootstrap $n=1000$. La visualización y edición del árbol filogenético fue realizada mediante el programa Archaeopteryx.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de los casos clínicos: patología y edad más frecuente

En primer lugar, se evaluó cual es la edad y el tipo de patología más frecuente en los animales de los que proceden las muestras de los casos clínicos estudiados.

En la **Figura 7.A** se observa que las patologías respiratorias (52%) y digestivas (28%) son las más frecuentes en los animales de los que proceden las muestras españolas. No obstante, estos resultados no se pueden contrastar con estudios previos realizados en España [53, 64, 86] ya que, por lo general, no indican el tipo de patología detectado en los animales de los que proceden las muestras; solamente se indica en un estudio [54] que los animales presentaron problemas respiratorios, digestivos y reproductivos; y en otro estudio [87] se comenta que los animales tenían problemas reproductivos y abortos. Por otro lado, los datos obtenidos en el presente trabajo sí que coinciden con estudios previos que indican que las patologías respiratorias y digestivas se detectan de manera frecuente en los casos de infección por BVDV debido a que el efecto inmunosupresor de este agente favorece la infección por otros agentes patógenos que afectan, principalmente, a los tractos digestivo y respiratorio [37]. Apoyando esta hipótesis se encuentra el hecho de que 57 de las 110 muestras españolas proceden de animales que están infectados con agentes patógenos propios del complejo respiratorio bovino (**Tabla A1.2** del **Anexo I**) el cual, como bien indica su nombre, conlleva la manifestación de síntomas respiratorios en el ganado.

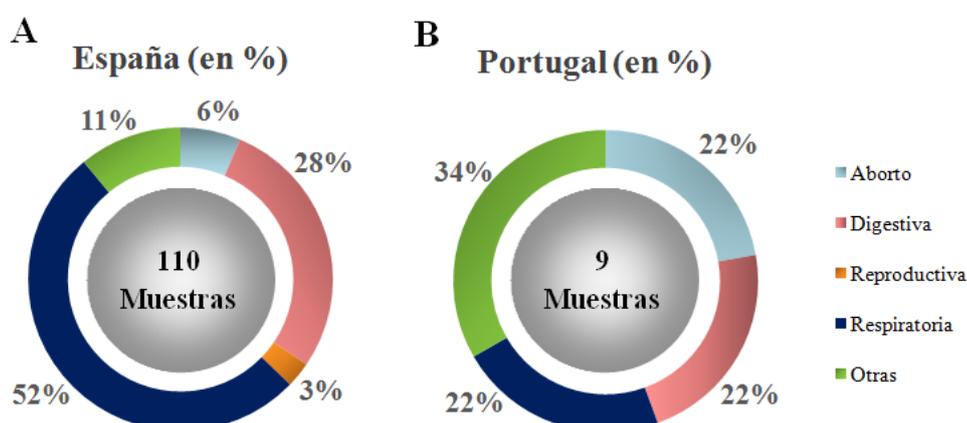


Figura 7. Tipos de patologías detectadas en los animales españoles (A) y portugueses (B) de los que proceden las muestras infectadas con *Pestivirus* (en %).

En cuanto a las muestras procedentes de Portugal, se observa en la **Figura 7.B** que el 22% de las muestras se obtuvieron de abortos, el 22% de los casos proceden de animales que presentaron patologías respiratorias, el 22% se corresponde con animales que presentaron patologías digestivas y del 34% restante no se conoce la patología exacta. No obstante, no se pueden establecer conclusiones

precisas teniendo en cuenta que el número total de muestras portuguesas evaluadas es pequeño (n=9) y que en estudios previos de este país [56] no se indican las patologías detectadas en los animales de los que proceden las muestras.

En cuanto a la edad de los animales de los que proceden las muestras, se ha descrito que durante los primeros días de vida los terneros se encuentran más protegidos frente al virus BVDV debido a los anticuerpos que reciben de la madre a través del calostro. No obstante, cuando dejan de tomar leche (aproximadamente a los 45 días de edad) los terneros se empiezan a alimentar con pienso y en la mayoría de los casos se trasladan de la explotación en la que han nacido a otra explotación diferente. El estrés generado por el cambio de ambiente provoca una inmunosupresión en los animales que favorece la infección con distintas enfermedades, entre ellas la diarrea viral bovina [88]. Partiendo de esta base, se evaluó que porcentaje de muestras proceden de animales mayores y menores de 45 días en los casos clínicos españoles y, tal y como se observa en la **Figura 8**, efectivamente hay mayor proporción de muestras españolas procedentes de animales mayores de 45 días (69%) que de animales menores de 45 días (31%).

En cuanto a los casos clínicos portugueses, puesto que solo se conoce la edad de los animales en dos casos, no se dispone de datos suficientes para determinar a qué edad se detectó con mayor frecuencia la infección con BVDV.

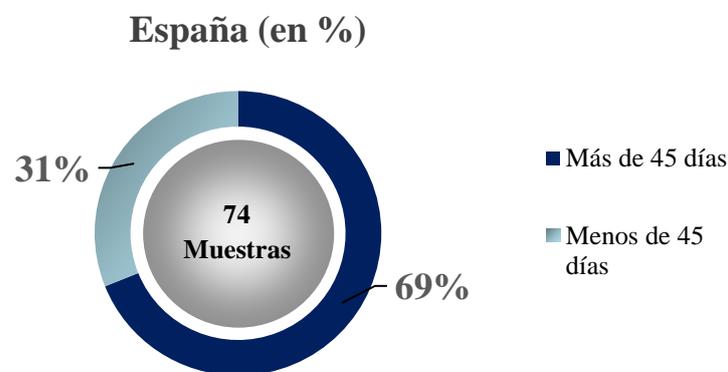


Figura 8. Edad de los animales de los que proceden las muestras de los casos clínicos españoles (en %). Para realizar los cálculos, de los 110 casos clínicos españoles solo se utilizaron los 74 para los cuales se conoce la edad del animal.

5.2 Determinación del genotipo de BVDV presente en las muestras de los casos clínicos de España y de Portugal

La región 5'UTR se encuentra altamente conservada entre los miembros del género *Pestivirus* y se utiliza de manera frecuente para realizar estudios de evaluación filogenética puesto que permite diferenciar entre los genotipos 1 y 2 del virus BVDV [24]. Partiendo de esta base, mediante RT-qPCR

se amplificó la región 5'UTR con el objetivo de determinar si las 119 muestras infectadas con *Pestivirus* y evaluadas en el presente trabajo están infectadas con BVDV-1 o BVDV-2.

Como se observa en la **Tabla 9** y en la **Tabla A3** del **Anexo III**, se detectó la presencia de BVDV-1 en 105 de las de las 110 muestras españolas evaluadas. Estos resultados se correlacionan con estudios previos que indican que, en España, el genotipo 1 del virus BVDV se encuentra ampliamente extendido y es el agente responsable de la mayoría de los casos reportados de ganado bovino afectado por diarrea viral bovina [53, 54, 64, 89, 90].

Por otro lado, de las 110 muestras españolas solamente en dos procedentes de Cataluña (casos clínicos 58 y 20) se identificó el virus BVDV-2. Este resultado coincide con estudios previos que indican que el genotipo BVDV-2, aunque con menor frecuencia que el genotipo 1, también ha sido detectado en rebaños del norte de España (Galicia y Asturias) [86, 87].

Tabla 9. Identificación del genotipo de BVDV mediante RT-qPCR. Se utilizaron dos ensayos, uno para determinar la presencia de BVDV-1 y otro para BVDV-2.

	Positivos en el ensayo general de <i>Pestivirus</i>	Positivos en el ensayo de BVDV-1	Positivos en el ensayo de BVDV-2	Negativos en los ensayos de BVDV-1 y BVDV-2
Nº de casos de España	110	105 ^(*)	2 ^(*)	4
Nº de casos de Portugal	9	8	1	-

^(*) La muestra de un caso clínico (número 20) salió positiva tanto en el ensayo de BVDV-1 como en el de BVDV-2.

La muestra del caso clínico 20 (procedente de Gerona) resultó positiva tanto al ensayo de BVDV-1 como al de BVDV-2 (**Figura 9.A** y **TablaA3** del **Anexo III**) lo cual parece indicar que el animal del que procede la muestra podría estar infectado con ambos genotipos del virus. Considerando que la co-infección de un animal con ambos genotipos del virus no es muy habitual y en España solo se ha reportado un caso similar en Asturias [87], se decidió realizar una segunda extracción de ácidos nucleicos de la muestra y repetir las RT-qPCR. Coincidiendo con los resultados del primer análisis, la segunda extracción de la muestra fue positiva en los ensayos de ambos genotipos (**Figura 9.B** y **TablaA3** del **Anexo III**).

A pesar de que la posible co-infección del animal del que procede la muestra del caso clínico 20 con ambos genotipos del virus BVDV explicaría los resultados obtenidos, también cabe la posibilidad de que se trate de un problema de inespecificidad de los cebadores utilizados en el ensayo para identificar el genotipo 1 del virus; pues los valores de Cq del ensayo de BVDV-2 (34,9 y 32,2) son muy similares al Cq del ensayo general de *Pestivirus* (34,0 y 35,5) mientras que el Cq para BVDV-1 tuvo valores más altos (37,4 y 36,1) y más cercanos al punto de corte para establecer un resultado

negativo (38,0). Para confirmar si se trataba de una co-infección o de una inespecificidad de los cebadores fue necesario realizar un estudio de secuenciación que se explicará en el apartado 5.3.

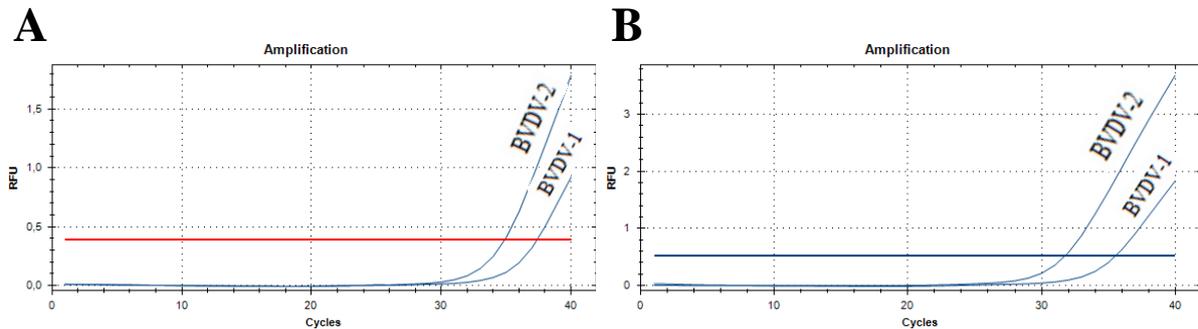


Figura 9. Curvas de amplificación de la región 5'UTR de la primera (A) y segunda (B) extracción de la muestra del caso clínico 20. La línea horizontal (roja en A y azul en B) indica el umbral de detección. En ambas extracciones se detectó antes el genotipo 2 del virus BVDV que el genotipo 1.

Con respecto a las cuatro muestras españolas (casos clínicos 3, 28, 90 y 102) en las que se detectó la presencia de *Pestivirus* pero que dieron negativo en los ensayos de BVDV-1 y BVDV-2 (Tabla 9 y TablaA3 del Anexo III), podrían o bien contener otros virus del género *Pestivirus* (BDV, Hobi-like) o bien contener cepas de BVDV que los cebadores de estos ensayos de RT-qPCR no fueron capaces de amplificar. Para averiguar los tipos de *Pestivirus* presentes en estas muestras fue necesario realizar un estudio de secuenciación tal y como se explicará en el apartado 5.3. No obstante, las muestras de los casos clínicos 28 y 102 no pudieron seguir siendo evaluadas por diversas razones. En la muestra del caso clínico 102 tras llevar a cabo una segunda extracción del material genético se realizó el ensayo de RT-qPCR general de *Pestivirus* pero el resultado fue negativo; una posible explicación de por qué en la primera extracción de la muestra sí se detectó *Pestivirus* pero en la segunda extracción no, sería que, como se trata de una muestra antigua recibida en el 2015, el RNA del virus se ha degradado y por eso no se ha detectado en el segundo análisis de la RT-qPCR. En cuanto a la muestra del caso clínico 28, la razón por la que no se pudo hacer más análisis es porque se agotó la muestra que recibió el laboratorio.

Otra muestra que llama la atención es la del caso clínico 38. Aunque salió positiva en el ensayo de BVDV-1 existe una diferencia considerable entre los Cq del ensayo general de *Pestivirus* (30,6) y BVDV-1 (37,5) que podría explicarse de varias maneras. Como se ha comentado previamente, el alto valor del Cq de BVDV-1 podría deberse a inespecificidad de los cebadores o a que el RNA viral presente en la muestra extraída se ha degradado. No obstante, otra posible explicación sería que el ensayo general de *Pestivirus* está detectando otros virus de dicho género (BDV, Hobi-like). Para intentar descartar alguna de las hipótesis propuestas, se realizó una segunda extracción del material genético y, puesto que la muestra es un *pool* de dos pulmones, se decidió realizar la extracción a cada pulmón por separado. Al analizar las segundas extracciones con los ensayos del genotipo 1 y 2 de

BVDV, los dos pulmones dieron negativo en ambos ensayos (**TablaA3** del *Anexo III*) por lo que, en principio, la hipótesis más acertada hasta el momento sería que la muestra estaba infectada con BDV o Hobi-like y que en la primera extracción resultó positiva a BVDV-1 por inespecificidad de los cebadores. Para confirmar si dicha hipótesis es cierta, se realizó un estudio de secuenciación que se explicará en el apartado 5.3.

Por último en lo referente a las muestras españolas, cabe destacar la muestra del caso clínico 91 que en un primer análisis resultó negativa para los ensayos de ambos genotipos de BVDV. Puesto que la muestra es antigua (se recibió en el 2016) existía la posibilidad de que el RNA viral de la primera extracción se hubiera degradado y, por ello, se decidió realizar una segunda extracción en la cual sí que se detectó BVDV-1.

En cuanto a Portugal, de las 9 muestras evaluadas 8 fueron positivas al genotipo 1 de BVDV mientras que la muestra restante (procedente de Oporto, caso clínico 116) fue positiva al genotipo 2. Estos resultados se correlacionan con estudios previos que indican que, aunque el genotipo BVDV-1 es el más ampliamente extendido en Portugal, el genotipo BVDV-2 también ha sido detectado [56].

5.3 Estudio de los subgenotipos de BVDV más frecuentes en España

5.3.1 Amplificación del fragmento a secuenciar de la región 5'UTR

Como previamente se ha descrito, los ensayos de RT-qPCR usados para amplificar la región 5'UTR solo permiten identificar y diferenciar la presencia de los genotipos 1 y 2 de BVDV; sin embargo, no permiten establecer cuál es el subgenotipo del virus infectante ni permiten identificar la presencia de otros géneros de *Pestivirus* (BDV, Hobi-like). Por ello, se decidió secuenciar un fragmento (de aproximadamente 300 pb) de la región 5'UTR para determinar, a nivel de subgenotipo, el tipo de *Pestivirus* presente en la muestra.

Puesto que por motivos económicos no fue factible secuenciar todas las muestras de los 119 casos clínicos, se decidió centrar el estudio en España y seleccionar muestras de casos representativos de todas las comunidades autónomas para las cuales se disponía de muestra. En dicha selección se tuvieron en cuenta dos criterios. El primero de ellos fue que el valor Cq del ensayo general de *Pestivirus* debía ser cuanto más bajo (inferior a 33) mejor ya que a mayor Cq menor es la carga viral de BVDV presente y, por lo tanto, más difícil es obtener una secuencia limpia y fidedigna. El segundo criterio establecido fue que todas las muestras debían proceder de granjas diferentes; carece de sentido secuenciar dos muestras procedentes de la misma granja ya que las probabilidades de que el subgenotipo del virus que está presente en ambas muestras sea el mismo son bastante altas.

En base a los criterios comentados, se seleccionaron un total de 42 casos clínicos de España y se decidió también incluir la muestra portuguesa (caso clínico 116) que salió positiva en el ensayo RT-qPCR específico para el genotipo BVDV-2.

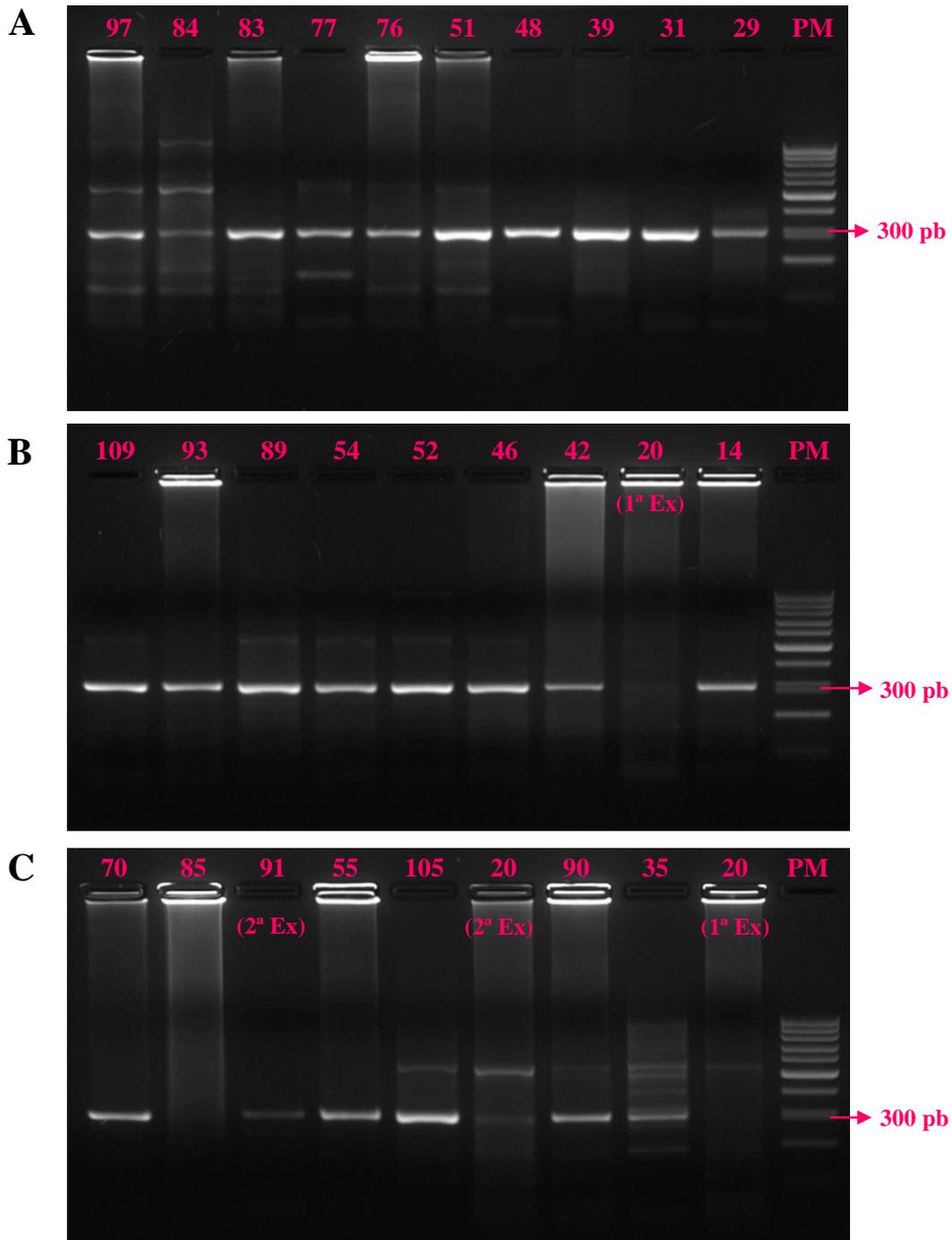


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación de la PCR convencional para la detección de *Pestivirus*. El fragmento de la región 5'UTR se amplificó utilizando los cebadores B_E (fw) y B₂ (rv) y tiene un tamaño aproximado de 300 pb. La temperatura de annealing utilizada es **A)** 58°C **B)** 60°C **C)** 55,4°C (caso clínico 20, 2ª Ex), 56°C (casos clínicos 91, 2ª Ex; y 20, 1ª Ex), 59°C (casos clínicos 105, 85 y 35), 60°C (casos clínicos 90, 70 y 55). En la parte superior de cada carril se indica el caso clínico al que pertenece la muestra evaluada.

En la **Figura 10** y en la **Figura A4** del **Anexo IV** se observan las muestras amplificadas mediante PCR convencional y visualizadas en gel de agarosa. En la mayoría de los casos se obtuvo una banda del tamaño apropiado (300 pb); sin embargo, en algunas muestras se observó la presencia de una o varias bandas adicionales aunque estas últimas tenían menor intensidad que la banda de interés. Estas amplificaciones inespecíficas podrían explicarse teniendo en cuenta que las muestras clínicas evaluadas no solo contienen *Pestivirus* sino también otros agentes a cuyos genomas podrían haber hibridado de manera inespecífica los cebadores utilizados en el ensayo de la región 5'UTR descrito por Letellier [58].

Por otro lado cabe destacar que, para secuenciar la muestra amplificada se consideró que la intensidad de la banda de interés debía ser mayor que la intensidad del resto de bandas. Por ello, con muchas de las muestras se probaron varias temperaturas de annealing hasta conseguir la intensidad adecuada de la banda de interés.

5.3.1.1 Análisis de la muestra del caso clínico 20

En el caso de la muestra 20 que procedía de un animal posiblemente co-infectado con los genotipos 1 y 2 de BVDV, con la primera extracción se probaron varias temperaturas de annealing pero no se obtuvo una amplificación adecuada de la banda de interés (**Figura 10.B** y **Figura 10.C**). Utilizando el RNA de la segunda extracción, aunque sí se obtuvo la banda de interés, ésta era mucho más tenue que otra banda que salió de manera inespecífica a 500 pb (**Figura 10.C**) lo cual imposibilitó la secuenciación directa de la muestra.

Considerando este problema, se decidió que la mejor estrategia sería purificar a partir del gel de agarosa la banda de 300 pb y, después, realizar un experimento de clonación para obtener por separado las posibles secuencias de los virus BVDV-1 y BVDV-2.

Se ha descrito que el vector pGEM-T Easy permite clonar eficazmente fragmentos de alrededor de 300 pb de la región 5'UTR del virus BVDV [91]. Por ello, una vez purificado a partir del gel de agarosa (**Figura 11.A**), el cDNA del virus se ligó con el vector pGEM-T (muy similar al pGEM-T Easy) y se transformaron células competentes DH5 α . Contrariamente a lo esperado, las células tardaron alrededor de 48 horas en crecer (normalmente en 24 horas ya se tiene una cantidad considerable de colonias) y, cuando se analizaron varios clones, se vio que ninguno de ellos había incorporado el inserto. En la **Figura 11.B**, se observa que los clones en vez de presentar una banda a 500 pb (300 pb del inserto más 200 pb del vector) mostraron una banda de aproximadamente 200 pb que se corresponde con el vector recircularizado sin el inserto.

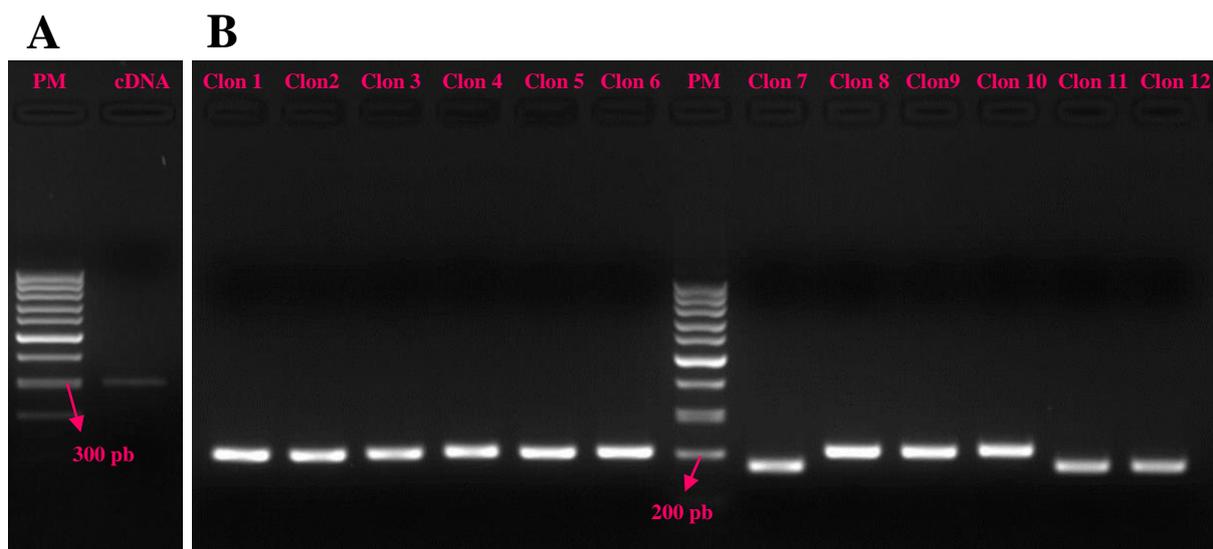


Figura 11. Análisis de la muestra del caso clínico 20. A) Comprobación de la correcta purificación del cDNA. Una vez purificado el cDNA de la muestra, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que solamente aparece la banda de interés (300 pb). **B) Comprobación de la incorporación del inserto.** Se extrajo el ácido nucleico de los clones mediante choque térmico y, utilizando los cebadores T7 (fw) y M13 (rv), se amplificó mediante PCR la zona del vector en la que se incorpora el inserto. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Estos resultados distan de los esperados ya que el vector pGEM-T es ampliamente conocido por su alta tasa de éxito en la clonación. Una posible explicación de por qué no funcionó el clonaje sería que no se utilizó suficiente cantidad de cDNA de la muestra en la reacción de ligación con el vector y, para mejorar la eficacia de la ligación, en próximos experimentos sería conveniente aumentar la relación inserto/vector de 2:1 a 3:1 o incluso 4:1. No obstante, es de vital importancia recordar que la muestra del caso clínico 20 es una muestra de diagnóstico por lo que es probable que la banda de 300 pb purificada a partir del gel no solo contenga material genético de BVDV sino también de otros microorganismos lo cual pudo influir en el resultado del experimento.

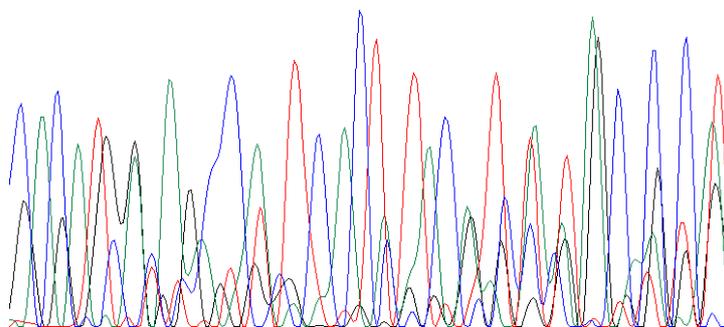


Figura 12. Secuenciación del cDNA de la muestra del caso clínico 20. La amplificación genómica de la región 5'UTR se llevó a cabo utilizando los cebadores B_E (fw) y B₂ (rv). A continuación, se visualizó el producto amplificado en un gel de agarosa al 1% y se purificó la banda de 300 pb. El material genético purificado se secuenció mediante el método de Sanger.

En base a esta última posibilidad, en una primera instancia, en vez de repetir el experimento de clonación se decidió secuenciar el cDNA de la muestra para comprobar el grado de pureza del mismo. Tal y como se observa en la **Figura 12**, en el archivo de la secuencia del cDNA hay tantos picos superpuestos que ni siquiera se pudo obtener una secuencia del material genético. Por tanto, dadas las condiciones en las que se encuentra el cDNA no es de extrañar que el experimento de clonación no tuviera un buen rendimiento.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que mediante la secuenciación de la región 5'UTR no es posible determinar el subgenotipo de los *Pestivirus* presentes en la muestra del caso clínico 20. Para averiguar dicho subgenotipo la mejor opción, en base a estudios previos descritos en la literatura [92], sería amplificar y secuenciar un fragmento del genoma que codifica para la proteína no estructural N^{pro}. En caso de que este método tampoco funcionase, otra alternativa sería amplificar y secuenciar un fragmento de genoma que codifica para la glicoproteína E2; no obstante, este último procedimiento es menos eficaz ya que la glicoproteína E2 no se encuentra tan conservada entre *Pestivirus* como la región 5'UTR y la proteína no estructural N^{pro} [93].

5.3.2 Obtención de las secuencias consenso mediante secuenciación de Sanger

En base a los resultados obtenidos en la amplificación de la región 5'UTR, se decidió secuenciar mediante el método de Sanger 42 de las 43 muestras inicialmente seleccionadas; la muestra del caso clínico 20 no se incluyó en el estudio por las razones comentadas en el apartado anterior. Una vez obtenidas las secuencias consenso (**Anexo V**), utilizando la herramienta bioinformática BLASTn se determinó, a nivel de subgenotipo, el tipo de *Pestivirus* presente en las muestras evaluadas.

Tabla 10. Determinación, a nivel de subgenotipo, del tipo de *Pestivirus* presente en las muestras seleccionadas para el estudio de secuenciación. Mediante PCR convencional se amplificó un fragmento (de aproximadamente 300 pb) de la región 5'UTR y, tras comprobar que aparecía la banda de interés en un gel de agarosa al 2%, se obtuvo la secuencia consenso mediante secuenciación de Sanger.

Subgenotipo	Nº Muestras	Subgenotipo	Nº Muestras
BVDV-1a	2	BVDV-2a	1
BVDV-1b	30	BVDV-2b	2
BVDV-1e	4	BDV-4	1
BVDV-1f	1	No <i>Pestivirus</i>	1

En la **Tabla 10** y en la **Tabla A6** del **Anexo VI** se observa que en 30 de las 42 muestras evaluadas se detectó la presencia de BVDV-1b y, además, las muestras en las que se identificó este subgenotipo no provienen de una única región de España sino de muchas provincias distintas (**Figura 13**). Estos resultados se correlacionan con estudios previos que indican que el subgenotipo BVDV-1b es el más extendido en nuestro país [53-55, 90]. Por otro lado, cabe destacar que se ha descrito que el subgenotipo BVDV-1b es el más frecuente en rebaños que presentan afecciones respiratorias y cuyos

animales están infectados por agentes propios del complejo respiratorio bovino [94, 95]. Estos datos coinciden con los obtenidos en el presente estudio ya que, de las 30 muestras en las que se identificó la presencia de BVDV-1b, el 40% proceden de animales que presentaron patologías respiratorias.

En cuanto al resto de subgenotipos de BVDV-1, en dos muestras se detectó la presencia del subgenotipo 1a, en cuatro se identificó el 1e y en una se detectó el 1f. Por otro lado, en una muestra se identificó el subgenotipo BVDV-2a (caso clínico 58, Lérida) y en dos se detectó BVDV-2b (caso clínico 3, Lérida; caso clínico 116, Portugal). Cabe destacar que todos los subgenotipos de BVDV-1 (1a, 1b, 1e y 1f) detectados en el presente estudio así como el subgenotipo BVDV-2a ya han sido reportados previamente afectando a ganado bovino en España [55]; no obstante, aunque el subgenotipo BVDV-2b se había descrito afectando de manera puntual a varios rebaños de ovejas, no se había detectado en ganado bovino en nuestro país [96].



Figura 13. Distribución geográfica de los subgenotipos de BVDV-1, BVDV-2 y BDV-4 identificados en el presente estudio.

Por otro lado, la muestra del caso clínico 90 (procedente de Huesca) llama especialmente la atención. Los ensayos de RT-qPCR determinaron que el *Pestivirus* presente en la muestra no es BVDV y, gracias al posterior estudio de secuenciación, se determinó que se trata de un virus BDV-4 el cual tiene un 100% de similitud con otro virus BDV-4 que se aisló de un rebeco pirenaico ([Tabla A6 del Anexo VI](#)) [97]. Dado el porcentaje de similitud entre ambos virus así como la proximidad temporal (2016) y espacial (Huesca y Pirineos) de los dos animales infectados, cabría pensar que se trata de la misma cepa viral. Por otro lado, aunque el BDV afecta principalmente a ganado ovino y no al bovino, los resultados obtenidos correlacionan con estudios recientes en los que se han descrito

casos puntuales de BDV infectando a animales de otras especies tales como vacas o rebecos pirenaicos [98].

Por último, cabe destacar que la secuenciación también permitió establecer el tipo de *Pestivirus* presente en la muestra del caso clínico 38. Como se comentó en el apartado 5.2 del presente trabajo, la muestra de este caso clínico resultó positiva para BVDV-1 pero con un Cq (37,5) bastante alto en comparación con el Cq (30,6) obtenido para el ensayo general de *Pestivirus*. En un primer lugar se asumió que se debía a una especificidad de los cebadores del ensayo BVDV-1 o la degradación de la muestra por lo que se realizó una segunda extracción de RNA de los dos pulmones que formaban parte de la muestra por separado. Ambas segundas extracciones resultaron negativas a los ensayos específicos de BVDV-1 y BVDV-2 por lo que se pensó que el *Pestivirus* implicado podría ser BDV o Hobi-like. No obstante, tras realizar la secuenciación de las segundas extracciones se determinó la presencia de BVDV-1b. En base a esto, se puede concluir que el animal del que procede la muestra del caso clínico 20 estaba infectado con una cepa de BVDV-1b que los cebadores del ensayo de RT-qPCR para BVDV-1 tuvieron problemas para amplificar.

5.3.3 Análisis de homología de las muestras secuenciadas

Con el objetivo de evaluar el grado de similitud nucleotídica entre las secuencias de la región 5'UTR de los virus BVDV-1 y BVDV-2 identificados en este estudio, se realizó una matriz de homología con ayuda del programa SDT v 1.2.

En la **Figura 14** y en la **Tabla A7** del **Anexo VII** se muestran los porcentajes de homología entre las secuencias de los virus del genotipo BVDV-1. El análisis demuestra que la similitud de las secuencias varía aproximadamente entre un 87% y un 100%. Puesto que la secuencia de BVDV-1f presenta los porcentajes de homología más bajos, podría deducirse que el subgenotipo 1f es el más distante evolutivamente hablando. Por otro lado, se observa que los dos virus del subgenotipo BVDV-1a tienen un alto grado de similitud entre ellos (superior al 99%) y lo mismo sucede con los virus del subgenotipo BVDV-1e los cuales presentan una homología superior al 96%.

En cuanto al subgenotipo BVDV-1b, la identidad de secuencias varía desde un 93% hasta un 100% y se distinguen dos grupos diferenciados. En la **Figura 14** se observa que existe una sección de la matriz (desde la muestra 62_Seg hasta la muestra 36_Zar) en la que las secuencias tienen alto grado de identidad entre ellas (96-100%) y, por otro lado, se observa otra zona en la que el grado de similitud entre las secuencias es un poco más bajo (93-96%). Además, cabe destacar que las muestras de la sección conservada proceden, a excepción de unas pocas, del norte y del oeste de España. Estudios previos han demostrado que en determinadas regiones o países ha tenido lugar un proceso de evolución local [93]. Considerando estos datos, es posible que haya ocurrido lo mismo con el BVDV circulante en la región noroeste de nuestro país; de ser este el caso, la información se vería reflejada

en los árboles filogenéticos (comentados en el próximo apartado) ya que los conjuntos de secuencias de la zona conservada de la matriz se agruparían en un clado diferente al resto de secuencias de BVDV-1b.

Por último en lo referente a las secuencias de BVDV-1b, cabe destacar que los virus presentes en las muestras de los casos clínicos 43 y 45 tienen una identidad de secuencia del 100%. Además, aunque las muestras son de granjas distintas, ambas proceden de Asturias y se recibieron en el laboratorio con un día de diferencia; por tanto, podría deducirse que se trata de la misma cepa viral.

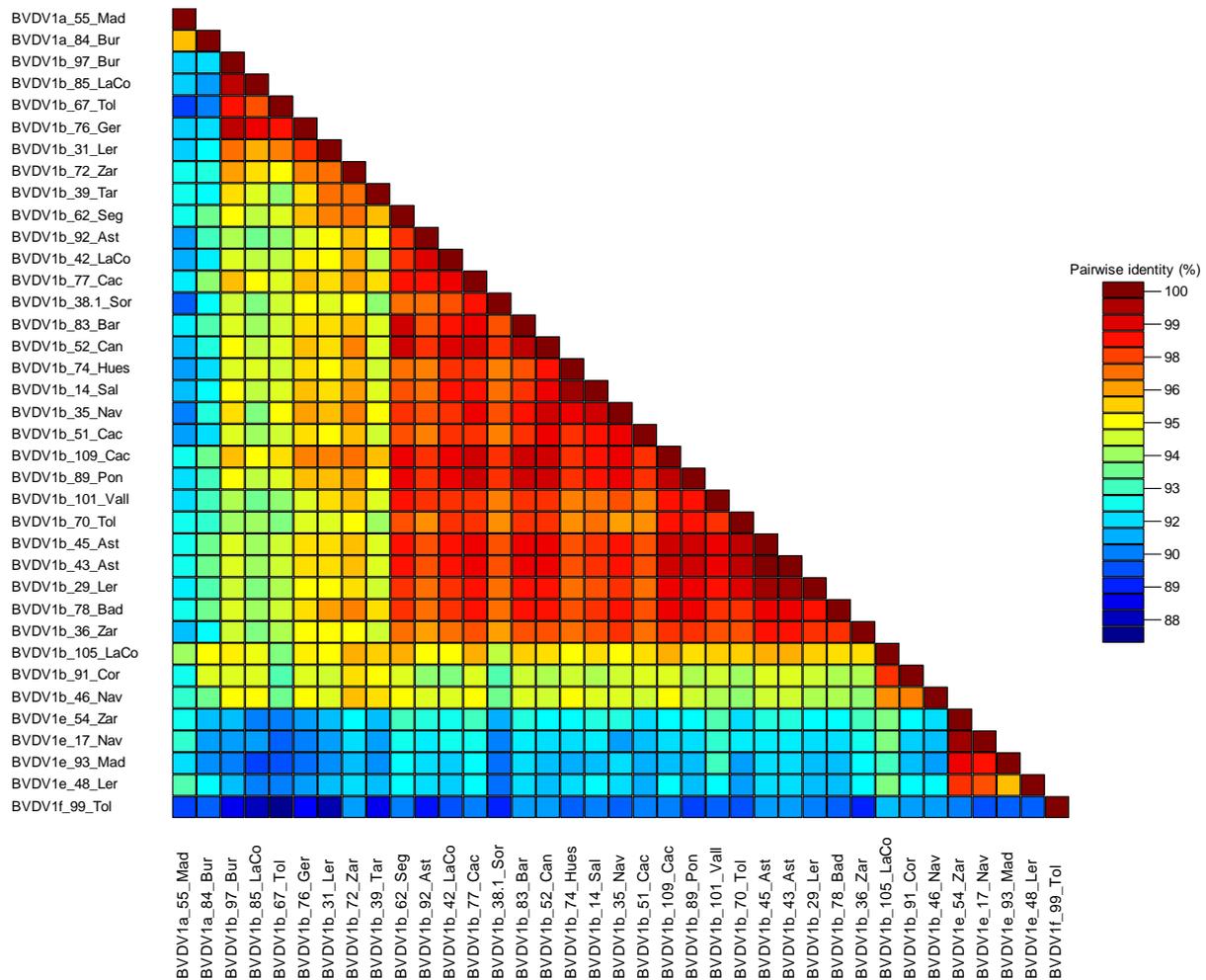


Figura 14. Matriz de identidad de secuencias (en %) de los virus BVDV-1 detectados en las muestras evaluadas. La matriz fue generada con el programa SDT v 1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso de la región 5'UTR. Cada celda coloreada representa el porcentaje de identidad entre las secuencias de las dos muestras indicadas en los laterales.

En lo que respecta a las secuencias del genotipo BVDV-2, en la [Figura 15](#) y en la [Tabla A8 del Anexo VIII](#) se observa que las secuencias pertenecientes al subgenotipo BVDV-2b tienen alto grado de similitud entre ellas (superior al 99%) y ambas muestran una homología menor (aproximadamente 93%) con la secuencia de BVDV-2a. Por otro lado, cabe destacar que ambos virus del subgenotipo 2b presentan una homología superior al 98% con las cepas PT2-01 y PT7-02 de BVDV-2b descritas en

un estudio previo de Portugal [56] y una homología superior al 99% con las seis cepas (G1, G218, F821, F834, F835, F837) de BVDV-2b reportadas en España en ganado ovino [96]. En cuanto al virus BVDV-2a detectado, este presenta una homología aproximada del 98% con la cepa viral GZ424 del subgenotipo 2a previamente reportada en Galicia [86].

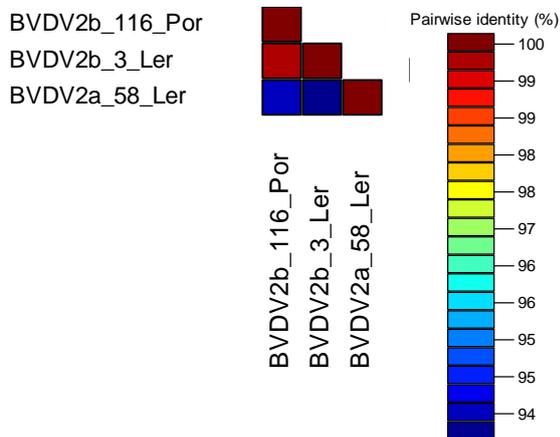


Figura 15. Matriz de identidad de secuencias (en %) de los virus BVDV-2 detectados en las muestras evaluadas. La matriz fue generada con el programa SDT v 1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso de la región 5'UTR. Cada celda coloreada representa el porcentaje de identidad entre las secuencias de las dos muestras indicadas en los laterales.

5.4 Análisis filogenético

Para evaluar las relaciones evolutivas entre las secuencias consenso de la región 5'UTR de los 42 *Pestivirus* incluidos en el estudio de secuenciación, se decidió realizar un análisis filogenético y, para ello, se elaboraron tres dendogramas distintos, uno para cada especie de *Pestivirus* detectada (BVDV-1, BVDV-2 y BDV).

En la **Figura 16** se muestra el árbol filogenético enraizado de los *Pestivirus* pertenecientes al genotipo BVDV-1 y se observa que el virus de subgenotipo 1f forma parte de un grupo monofilético separado con un alto valor de bootstrap (94%). Este resultado se correlaciona con lo visto en la matriz de homología previamente comentada por lo que se puede afirmar que, de los subgenotipos de BVDV-1 estudiados en el presente trabajo, el 1f es el más distante evolutivamente hablando.

Por otro lado, dejando a un lado el virus BVDV-1f se observan dos grupos monofiléticos claros, uno de ellos contiene a los virus de los subgenotipos 1a y 1e mientras que el otro contiene a los virus del subgenotipo 1b. Pese a que los valores de bootstrap no son demasiado altos, la topología del árbol es muy similar a la del filograma presentado en un estudio español previo sobre las cepas de BVDV circulantes por nuestro país [54]. Por tanto, en base al dendograma del presente trabajo así como al filograma del estudio comentado, se podría deducir que, por lo general, las cepas de los subgenotipos 1a y 1e circulantes por España presentan menor divergencia evolutiva entre ellas que con respecto al subgenotipo 1b.

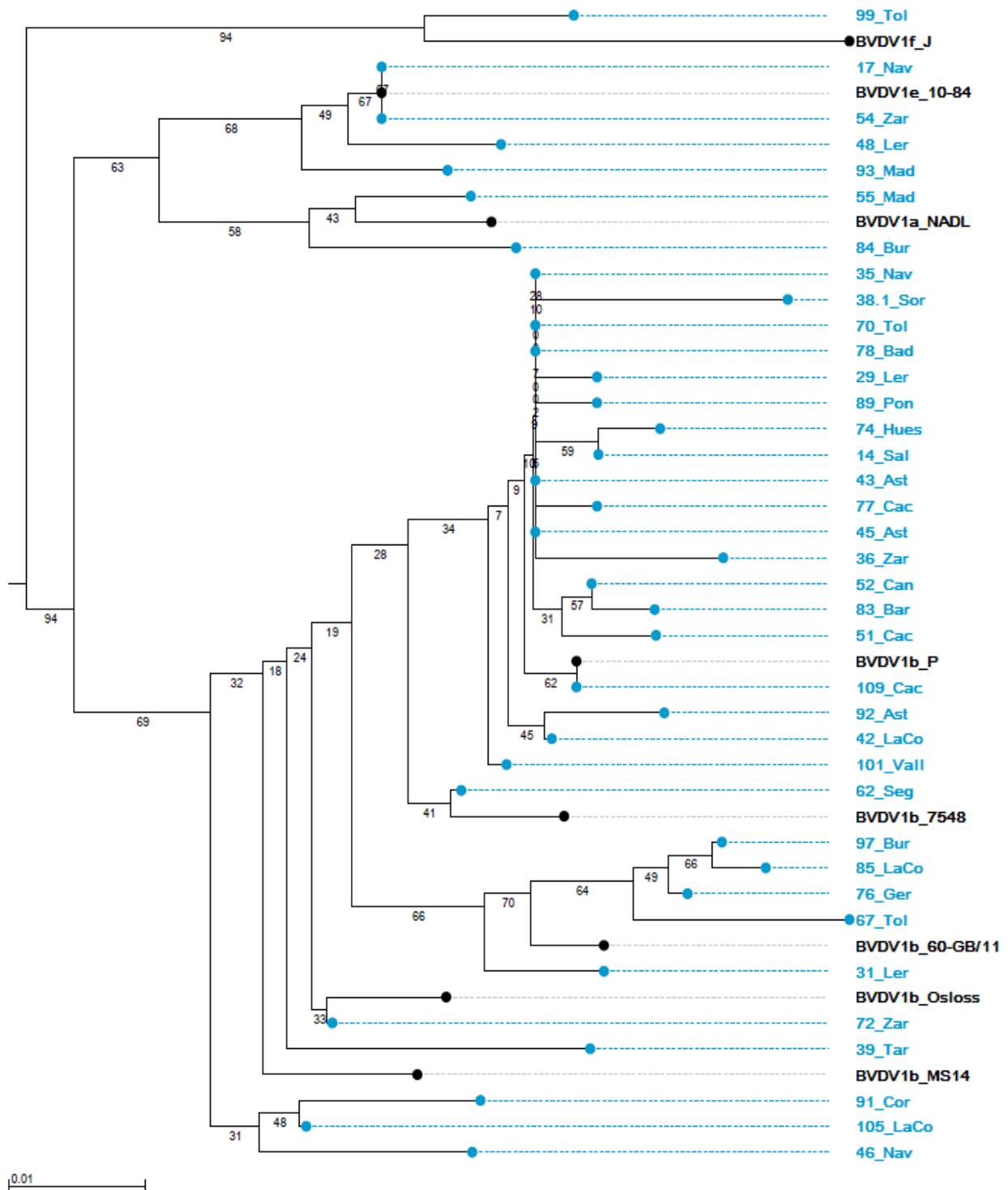


Figura 16. Análisis filogenético basado en un fragmento de 300 pb de la región 5'UTR de los virus **BVDV-1**. El filograma se elaboró mediante el método Neighbor-joining y usando un bootstrap n=1000 cuyos valores se muestran en porcentaje sobre las ramas. Las secuencias en azul son las evaluadas en este estudio mientras que las secuencias en negro son las cepas BVDV de referencia obtenidas de la base de datos GenBank (Tabla 9).

En cuanto a los virus BVDV-1b, se observa que dentro del mismo grupo monofilético, las secuencias pueden separarse en dos bloques distintos (Figura 16). Desde la parte inferior del filograma hasta la secuencia 97_Bur, la topología del árbol es clara y, pese a que los valores del bootstrap no son muy elevados, se distinguen bien las subdivisiones de las ramas. No obstante, desde la secuencia 62_Seg hasta la 35_Nav da la impresión de que el algoritmo utilizado para elaborar el árbol no pudo determinar la relación evolutiva entre las secuencias y el patrón de ramificación que presenta no es muy claro. Para apreciar mejor la ramificación de ese grupo de secuencias, se realizó un cladograma (Figura 17) en el cual se puede apreciar que el valor de bootstrap en muchas de las subdivisiones es 0%; por tanto, se debería tomar con cautela el patrón de ramificación mostrado ya que puede no ser correcto.

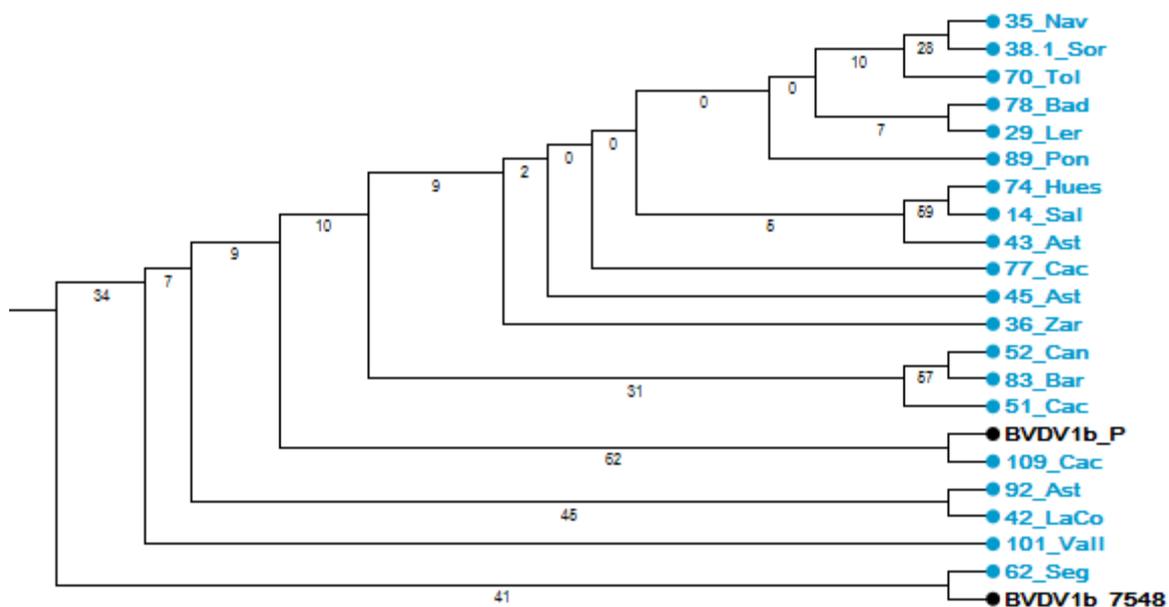


Figura 17. Análisis filogenético basado en un fragmento de 300 pb de la región 5'UTR de los virus BVDV-1. El cladograma se elaboró mediante el método Neighbor-joining y usando un bootstrap n=1000 cuyos valores se muestran en porcentaje sobre las ramas. Las secuencias en azul son las evaluadas en este estudio mientras que las secuencias en negro son las cepas BVDV de referencia obtenidas de la base de datos GenBank (Tabla 9).

Por otro lado, cabe destacar que este grupo de secuencias de BVDV-1b que el algoritmo no fue capaz de subdividir se corresponde con el grupo de secuencias que formaban parte de la sección más conservada de la matriz de identidad de secuencias elaborada con el programa SDT v 1.2 y comentada en el apartado 5.3.3. En dicho apartado se ha visto que estas secuencias tienen un grado de similitud mayor entre ellas que con el resto de virus BVDV-1b y se ha planteado la hipótesis de que en el norte y el oeste de España podría haberse dado un proceso de evolución local similar al descrito en un estudio [93] realizado en otros países. Por tanto, teniendo en cuenta la correlación entre los datos del estudio comentado y los resultados del análisis filogenético y de la matriz de homología del presente trabajo fin de máster, podría deducirse que, efectivamente, en el noroeste de España se ha dado un

proceso de evolución local del subgenotipo de BVDV-1b. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis, la mejor opción sería secuenciar los genes que codifican para las proteínas N^{pro} y E2 y hacer un análisis filogenético de las secuencias para ver si se obtiene, de nuevo, el mismo conjunto de virus BVDV-1b no correctamente clasificados.

Con respecto al árbol filogenético de los *Pestivirus* pertenecientes al genotipo BVDV-2 (Figura 18), se observan dos grupos monofiléticos claros; uno engloba a los virus del subgenotipo 2b y el otro engloba a los virus de los subgenotipos 2a y 2c.

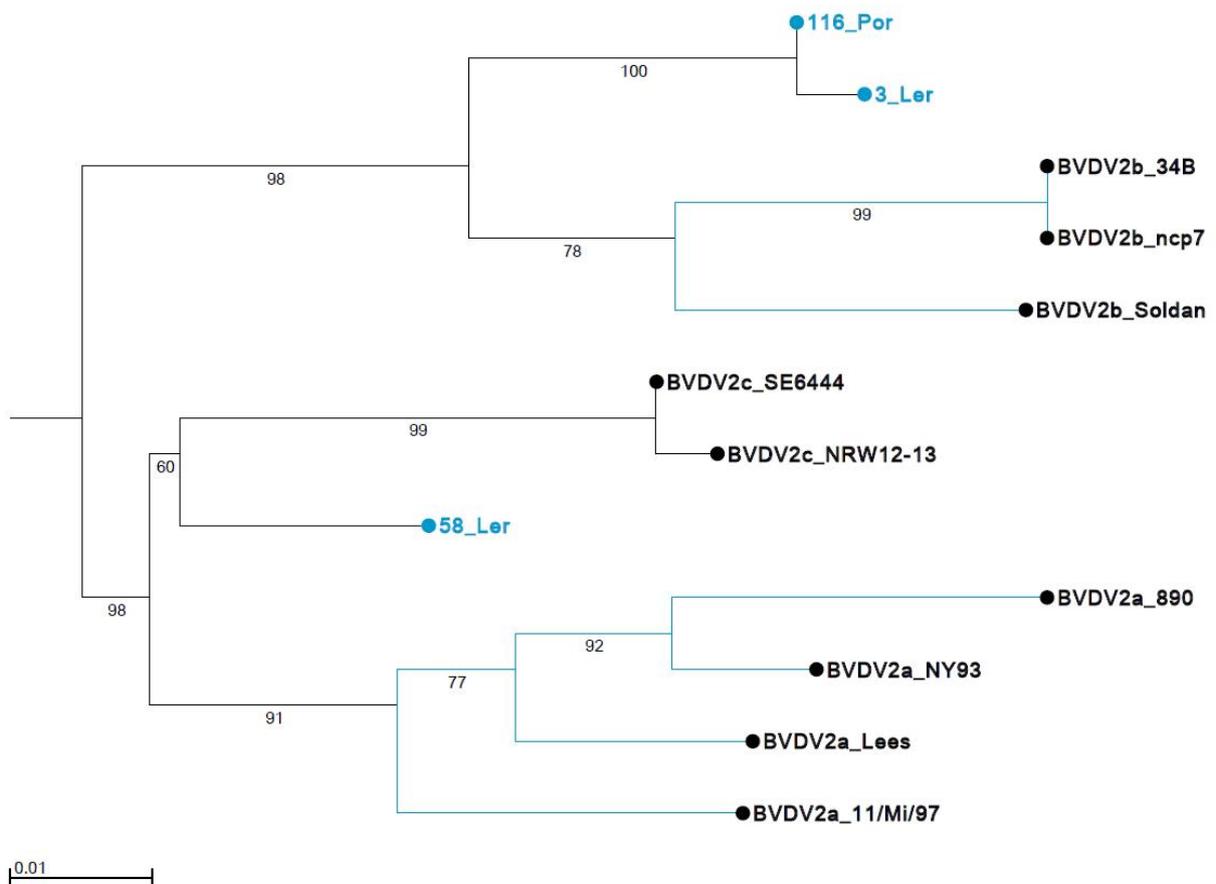


Figura 18. Análisis filogenético basado en un fragmento de 300 pb de la región 5'UTR de los virus BVDV-2. El filograma se elaboró mediante el método Neighbor-joining y usando un bootstrap n=1000 cuyos valores se muestran en porcentaje sobre las ramas. Las secuencias en azul son las evaluadas en este estudio mientras que las secuencias en negro son las cepas BVDV de referencia obtenidas de la base de datos GenBank (Tabla 9).

Los dos virus BVDV-2b detectados en el presente trabajo se encuentran dentro del mismo clado y el valor del bootstrap es 100%. En cuanto al virus detectado en la muestra del caso clínico 58, a pesar de que la herramienta BLASTn determinó que pertenecía al subgenotipo 2a, en el dendograma se observa que está dentro del clado de los virus del subgenotipo 2c. Considerando que la base de datos BLASTn incluye algunas secuencias no revisadas, mientras que en el análisis filogenético se

utilizaron solo secuencias de referencia empleadas previamente en otros estudios, la clasificación del subgenotipo mediante el filograma tiene mayor validez que la ofrecida por BLASTn. Por tanto, se puede concluir que el *Pestivirus* que está presente en la muestra del caso clínico 58 pertenece al subgenotipo BVDV-2c el cual no había sido reportado hasta el momento ni en España [55] ni en Portugal [56]. No obstante, cabe destacar que aunque se encuentra dentro del clado del subgenotipo 2c, la topología del árbol parece indicar que el virus presente en la muestra del caso clínico 58 se encuentra en un estado de evolución intermedia entre las cepas de subgenotipo 2a y las cepas de subgenotipo 2c.

Por último, en el árbol filogenético de los *Pestivirus* pertenecientes al genotipo BDV (Figura 19) se observa que el virus detectado en la muestra del caso clínico 90 pertenece al grupo monofilético del genotipo BDV-4 con un alto valor de bootstrap (100%). Cabe destacar que dicho genotipo de BDV es el único que se ha descrito en España hasta el momento [97, 99].

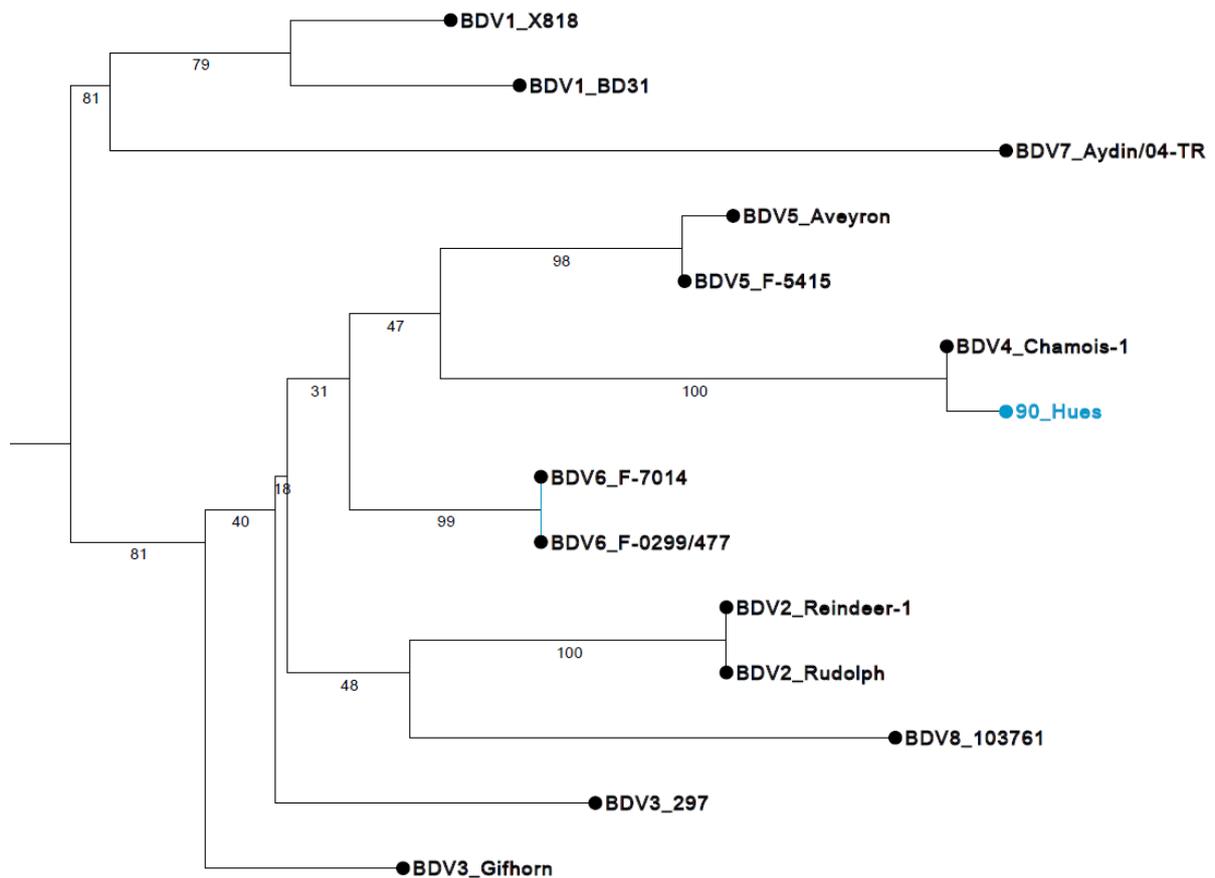


Figura 19. Análisis filogenético basado en un fragmento de 300 pb de la región 5'UTR de los virus BDV. El filograma se elaboró mediante el método Neighbor-joining y usando un bootstrap n=1000 cuyos valores se muestran en porcentaje sobre las ramas. Las secuencias en azul son las evaluadas en este estudio mientras que las secuencias en negro son las cepas BVDV de referencia obtenidas de la base de datos GenBank (Tabla 9).

A la vista de los resultados obtenidos en el análisis filogenético, se puede concluir que, a excepción del *Pestivirus* de la muestra del caso clínico 58, la clasificación de los virus ofrecida por la herramienta BLASTn se correlaciona con la ofrecida por los dendogramas.

5.5 Discusión general

En este trabajo se ha realizado una evaluación filogenética del virus de la diarrea viral bovina y, para ello, se han empleado muestras de 119 casos clínicos positivos a *Pestivirus* que fueron recibidas por el laboratorio de diagnóstico veterinario Exopol entre los años 2015 y 2019. La procedencia de los casos clínicos es diversa, se evaluaron 110 muestras procedentes de 25 provincias españolas y 9 muestras procedentes de 3 distritos portugueses.

En primer lugar, considerando la información recibida por parte del veterinario y/o ganadero se determinó que, en los animales de los que proceden las muestras, las patologías respiratorias fueron las más frecuentes seguidas por las patologías digestivas. Estos resultados coinciden con estudios previos que indican que las patologías respiratorias y digestivas se detectan de manera frecuente en los casos de infección por BVDV debido a que el efecto inmunosupresor de este agente favorece la infección por otros agentes patógenos que afectan, principalmente, a los tractos digestivo y respiratorio [37]. Además, cabe destacar que 60 de las 119 muestras evaluadas proceden de animales que han desarrollado el complejo respiratorio bovino.

Por otro lado, teniendo en cuenta solamente los casos clínicos en los cuales se conoce la edad del animal, se estableció que hay mayor proporción de muestras procedentes de animales mayores de 45 días que de animales menores de 45 días. Esto se debe posiblemente a que durante los primeros días de vida los terneros se encuentran más protegidos frente al virus BVDV debido a los anticuerpos que reciben de la madre a través del calostro. No obstante, cuando dejan de tomar leche (aproximadamente a los 45 días de edad) los terneros se empiezan a alimentar con pienso y en la mayoría de los casos se trasladan de explotación lo cual les provoca un estrés que conlleva una inmunosupresión que favorece la infección con BVDV u otros agentes [88].

A continuación, mediante el uso de ensayos de RT-qPCR se determinó la presencia de BVDV-1 en 105 de los 110 casos clínicos procedentes de España mientras que la presencia de BVDV-2 solamente se identificó en dos casos. Además, uno de los casos (número 20) de este país fue positivo a ambos genotipos de BVDV y 4 casos resultaron negativos a ambos genotipos. En cuanto a Portugal, en 8 de los 9 casos clínicos evaluados se detectó la presencia de BVDV-1 mientras que la muestra restante resultó positiva a BVDV-2. Estos resultados se correlacionan con estudios previos que indican que en ambos países el genotipo BVDV-1 es el más extendido y que, aunque con menor frecuencia, el genotipo BVDV-2 también ha sido detectado [55, 56].

Posteriormente, mediante secuenciación de la región 5'UTR se procedió a determinar los subgenotipos de BVDV más frecuentes en España. Para ello, se seleccionaron un total de 42 casos clínicos españoles representativos de todas las comunidades autónomas y, además, se incluyó una muestra clínica de Portugal en la que se había detectado BVDV-2. Uno de los casos clínicos españoles seleccionados fue el número 20, el cual procedía de un animal posiblemente co-infectado por BVDV-1 y BVDV-2; sin embargo, no fue posible obtener la secuencia de los virus infectantes mediante secuenciación directa de la muestra ni mediante experimentos de clonaje. Una metodología alternativa que podría realizarse para determinar el subgenotipo de BVDV en la muestra del caso clínico 20 sería secuenciar los genes que codifican para las proteínas N^{pro} o E2 [92, 93].

En general, mediante el estudio de secuenciación se determinó que el subgenotipo BVDV-1b es el más frecuente en España (n=30) y se detectaron, en menor medida, los subgenotipos 1a (n=2), 1e (n=4) y 1f (n=1) así como BVDV-2a (n=1) y BVDV-2b (n=2; una muestra de España y otra de Portugal). Además, en una muestra (caso clínico 90) se identificó la presencia de BDV-4. Cabe destacar que los subgenotipos 1a, 1b, 1e, 1f y 2a ya han sido reportados previamente infectando a ganado bovino en la Península Ibérica [55, 56]. Además, estudios previos han descrito que el BVDV-1b es el subgenotipo más frecuente en animales con afecciones respiratorias [94, 95], lo cual correlaciona con los datos obtenidos en el presente trabajo ya que el 40% de las 30 muestras identificadas como BVDV-1b proceden de animales que presentaron este tipo de patología. Por otro lado, hasta el momento en España el subgenotipo 2b solo había sido reportado afectando a ganado ovino y el BDV solamente se había detectado en ganado ovino y en rebecos pirenaicos [96, 98].

Por último, el análisis filogenético de las secuencias obtenidas demostró que dentro del genotipo BVDV-1, el subgenotipo 1f es el que mayor divergencia evolutiva muestra con respecto al resto. Además, en concordancia con estudios previos [54], se observó que las cepas de los subgenotipos 1a y 1e circulantes por España presentan menor divergencia evolutiva entre ellas que con respecto al subgenotipo 1b. Por otro lado, los datos indicaron que es muy probable que en el noroeste de España se haya dado un proceso de evolución local del subgenotipo BVDV-1b similar al descrito en otros países [93]; con el objetivo de confirmar esta hipótesis, la mejor opción sería secuenciar los genes que codifican para las proteínas N^{pro} y E2 y hacer un análisis filogenético de las secuencias.

Con respecto a los virus del genotipo BVDV-2, las dos muestras en las que se identificó el subgenotipo 2b se englobaron en un mismo clado; no obstante, el virus que según la herramienta BLASTn pertenecía al subgenotipo 2a (caso clínico 58), según el filograma se encuentra dentro del subgenotipo 2c. Considerando que la base de datos BLASTn incluye algunas secuencias no revisadas, mientras que en el análisis filogenético se utilizaron solo secuencias de referencia empleadas previamente en otros estudios, la clasificación del subgenotipo mediante el filograma tiene mayor validez que la ofrecida por BLASTn. Por tanto, se puede concluir que el *Pestivirus* que está presente

en la muestra del caso clínico 58 pertenece al subgenotipo BVDV-2c el cual no había sido reportado hasta el momento en la Península Ibérica [55, 56].

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han permitido actualizar la información sobre los subgenotipos de BVDV circulantes en España y, además, han ampliado el conocimiento actual de su distribución geográfica ya que se han utilizado muestras procedentes de provincias no contempladas en estudios previos. Por otro lado, los resultados confirman la presencia de nuevas cepas de BVDV-2 en el país, por lo que la implementación de estrategias de protección que incluyan a este genotipo debería ser evaluada. En definitiva, los datos obtenidos en el presente trabajo fin de máster podrían ser de utilidad para el desarrollo de mejores programas de control y/o erradicación de esta enfermedad en el país.

6. CONCLUSIONES

1. La mayoría de las muestras positivas a *Pestivirus* que se utilizaron en este estudio procedieron de animales con patologías respiratorias (50%) y digestivas (28%). Por otro lado, el número de casos positivos a este agente fue mayor en el grupo de animales mayores de 45 días (69%) que en el de menores de 45 días (31%).
2. El subgenotipo BVDV-1b es el más frecuente en España, aunque también se detectaron los subgenotipos 1a, 1e y 1f; todos los cuales han sido descritos en estudios previos del país.
3. El genotipo BVDV-2 también fue identificado en España, concretamente los subgenotipos 2b y 2c. El subgenotipo 2c es la primera vez que se detecta en el país y el 2b, aunque había sido previamente descrito afectando a ganado ovino, hasta el momento no se había identificado en bovino.
4. En un caso clínico español se detectó la presencia de BDV-4 lo cual corrobora que, aunque de manera poco frecuente, el BDV es capaz de ocasionar infección en ganado bovino.
5. En cuanto a Portugal, se determinó que el BVDV-1 es el genotipo más frecuente pero también se identificó un virus BVDV-2b el cual tiene una homología superior al 98% con cepas de ese mismo subgenotipo descritas en estudios previos del país.

-
1. Most of the positive samples to *Pestivirus* used in this study came from animals with respiratory (50%) and digestive (28%) diseases. Besides, the number of positive cases to this

agent was greater in the group of animals older than 45 days (69%) than in those younger than 45 days (31%).

2. BVDV-1b is the most frequent subgenotype in Spain. Moreover, subgenotypes 1a, 1e and 1f were also detected. All the BVDV-1 subgenotypes identified in this project had already been described in previous studies in the country.
3. Genotype BVDV-2 was also identified in Spain, specifically subgenotypes 2b and 2c. Although 2b had previously been described affecting sheep in our country, it had not been identified in cattle up to now. As for 2c, this is the first time that has been detected in Spain.
4. The presence of BDV-4 was also confirmed in one bovine Spanish sample. This finding corroborates that, although infrequently, BDV is capable of causing infection in cattle.
5. Regarding Portugal, it was determined that BVDV-1 is the most frequent genotype. Nevertheless, a BVDV-2b virus was also identified and it showed high homology (greater than 98%) with some BVDV-2b strains previously described in this country.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Blome, S., M. Beer, and K. Wernike, *New Leaves in the Growing Tree of Pestiviruses*. Adv Virus Res, 2017. **99**: p. 139-160.
2. Simmonds, P., et al., *ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae*. J Gen Virol, 2017. **98**(1): p. 2-3.
3. Tautz, N., B.A. Tews, and G. Meyers, *The Molecular Biology of Pestiviruses*. Adv Virus Res, 2015. **93**: p. 47-160.
4. Blome, S., et al., *Classical Swine Fever-An Updated Review*. Viruses, 2017. **9**(4).
5. Animal, O.M.d.S. *Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2019*. 2019 [cited 2019 25/04/2019]; Available from: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2019/>.
6. Smith, D.B., et al., *Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae*. J Gen Virol, 2017. **98**(8): p. 2106-2112.
7. Giammarioli, M., et al., *Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches*. Biologicals, 2015. **43**(4): p. 220-224.
8. Bauermann, F.V., et al., *HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses*. J Vet Diagn Invest, 2013. **25**(1): p. 6-15.
9. Yesilbag, K., G. Alpay, and P. Becher, *Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus*. Viruses, 2017. **9**(6).

10. Houe, H., A. Lindberg, and V. Moennig, *Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe*. J Vet Diagn Invest, 2006. **18**(5): p. 427-436.
11. Ridpath, J.F., *Bovine viral diarrhoea virus: global status*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2010. **26**(1): p. 105-121.
12. BVDzero. *Infografía Diarrea Vírica Bovina (BVD)*. 2019 [cited 2019 24/03/2019]; Available from: <http://www.bvdzero.es/es/infographia/infograph1.html>.
13. Ridpath, J.F., et al., *Lymphocytopenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV*. Virus Res, 2006. **118**(1-2): p. 62-69.
14. Institute of Veterinary Virology, U.o.B. *BVDV Biotypes*. 2019 [cited 2019 24/03/2019]; Available from: <http://www.bvd-info.ch/static/veterinarians/biotypes.html>.
15. Bolin, S.R. and D.L. Grooms, *Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2004. **20**(1): p. 51-68.
16. Neill, J.D., *Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus*. Biologicals, 2013. **41**(1): p. 2-7.
17. Schweizer, M. and E. Peterhans, *Pestiviruses*. Annu Rev Anim Biosci, 2014. **2**: p. 141-163.
18. Rondón, I., *Diarrea viral bovina: patogénesis e inmunopatología*. MVZ Córdoba, 2006. **11**(1): p. 694-704.
19. Brock, K.V., R. Deng, and S.M. Riblet, *Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR*. J Virol Methods, 1992. **38**(1): p. 39-46.
20. Cai, D., et al., *Genomic characterization of three bovine viral diarrhoea virus isolates from cattle*. Arch Virol, 2016. **161**(12): p. 3589-3592.
21. Isken, O., et al., *Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhoea virus coordinate translation and replication of the viral RNA*. Rna, 2004. **10**(10): p. 1637-1652.
22. Yu, H., et al., *A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhoea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA*. J Virol, 2000. **74**(13): p. 5825-5835.
23. Moes, L. and M. Wirth, *The internal initiation of translation in bovine viral diarrhoea virus RNA depends on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon*. Virol J, 2007. **4**: p. 124.
24. Giangaspero, M. and R. Harasawa, *Species characterization in the genus Pestivirus according to palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region*. J Virol Methods, 2011. **174**(1-2): p. 166-72.
25. Vilcek, S., et al., *Genetic analysis of pestiviruses at the 3' end of the genome*. Virus Genes, 1999. **18**(2): p. 107-114.
26. Donis, R.O., *Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 1995. **11**(3): p. 393-423.

27. Wang, F.I., et al., *Structures and Functions of Pestivirus Glycoproteins: Not Simply Surface Matters*. *Viruses*, 2015. **7**(7): p. 3506-3529.
28. Hilton, L., et al., *The NPro product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation*. *J Virol*, 2006. **80**(23): p. 11723-11732.
29. Chen, Z., et al., *Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhea virus*. *Virology*, 2007. **366**(2): p. 277-292.
30. Klemens, O., D. Dubrau, and N. Tautz, *Characterization of the Determinants of NS2-3-Independent Virion Morphogenesis of Pestiviruses*. *J Virol*, 2015. **89**(22): p. 11668-11680.
31. Weiskircher, E., et al., *Bovine viral diarrhea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes*. *Virol J*, 2009. **6**: p. 185.
32. Ansari, I.H., et al., *Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5B locus in virion assembly*. *J Virol*, 2004. **78**(18): p. 9612-9623.
33. Mathapati, B.S., et al., *Entry of bovine viral diarrhea virus into ovine cells occurs through clathrin-dependent endocytosis and low pH-dependent fusion*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2010. **46**(5): p. 403-407.
34. ViralZone. *Pestivirus*. 2019 [cited 2019 17/03/2019]; Available from: https://viralzone.expasy.org/39?outline=all_by_protein.
35. Institute of Veterinary Virology, U.o.B. *Replication cycle of BVDV* 2019 [cited 2019 17/03/2019]; Available from: <http://www.bvd-info.ch/static/veterinarians/replication.html>.
36. ANEMBE. *Diarrea Vírica Bovina (BVD)*. 2019 [cited 2019 23/03/2019]; Available from: <https://www.anembe.com/wp-content/uploads/BVD-Ficha-tecnica.pdf>.
37. Fulton, R.W., et al., *Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States*. *Can J Vet Res*, 2009. **73**(4): p. 283-291.
38. Lanyon, S.R., et al., *Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis*. *Vet J*, 2014. **199**(2): p. 201-209.
39. Brodersen, B.W., *Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control*. *Vet Pathol*, 2014. **51**(2): p. 453-464.
40. Rosete, J., et al., *Control zosanitario de la diarrea viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina, neosporosis y leptospirosis en bovinos en pastoreo en el trópico húmedo de Tabasco*. Folleto técnico Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2014.

41. ANEMBE. *Diagnóstico de laboratorio de la infección por el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV)*. 2019 [cited 2019 23/03/2019]; Available from: <https://www.anembe.com/wp-content/uploads/BVD-Manual-de-diagnostico.pdf>.
42. Dubovi, E.J., *Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus*. Biologicals, 2013. **41**(1): p. 8-13.
43. Richter, V., et al., *A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection*. Vet J, 2017. **220**: p. 80-87.
44. Piniór, B., et al., *A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide*. Prev Vet Med, 2017. **137**(Pt A): p. 77-92.
45. BVDzero. *Estadísticas sobre la BVD en España*. 2019 [cited 2019 24/03/2019]; Available from: http://www.bvdzero.es/es/estadisticas_bvd.html.
46. Calvo, C. *Plan de vigilancia y control del BVD en Galicia*. 2016 [cited 2019 25/04/2019]; Available from: <http://www.campogalego.com/es/leche/plan-de-vigilancia-y-control-del-bvd-en-galicia/>.
47. Lindberg, A.L. and S. Alenius, *Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations*. Vet Microbiol, 1999. **64**(2-3): p. 197-222.
48. Sandvik, T., *Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2004. **20**(1): p. 151-169.
49. Astiz, S., *Campañas de erradicación y control frente al BVD en Europa: diferencias, claves y resultados*. Afriga, 2015. **118**: p. 56-62.
50. Arnaiz, I., C. Eiras, and J. Diéguez, *La diarrea vírica bovina, una enfermedad que se puede controlar*. Ganadería, 2010. **70**: p. 30-33.
51. Arnaiz, I., et al., *Programas de control de IBR y BVD en España*. Producción Animal, 2012. **273**: p. 22-36.
52. Moennig, V. and P. Becher, *Pestivirus control programs: how far have we come and where are we going?* Anim Health Res Rev, 2015. **16**(1): p. 83-87.
53. Arias, P., et al., *Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain*. Vet Microbiol, 2003. **96**(4): p. 327-336.
54. Hurtado, A., et al., *Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain*. Virus Res, 2003. **92**(1): p. 67-73.
55. Diéguez, J., M. Cerviño, and E. Yus, *Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) genetic diversity in Spain: A review*. Spanish Journal of Agricultural Research, 2017. **15**(2).
56. Barros, S.C., et al., *Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus*. Virus Res, 2006. **118**(1-2): p. 192-195.
57. Benito, A., et al., *Development of a one-step RT-qPCR assay for identification of ruminant pestivirus*. SIDILV Congress (Italy), 2015.

58. Letellier, C., et al., *Detection and genotyping of bovine diarrhea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region*. *Vet Microbiol*, 1999. **64**(2-3): p. 155-167.
59. CBRC and AIST. *MAFFT version 7*. 2013 [cited 2019 12/05/2019]; Available from: <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>.
60. NCBI. *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. 2019 [cited 2019 12/05/2019]; Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
61. SIB. *LALIGN*. 2019 [cited 2019 12/05/2019]; Available from: https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html.
62. Colett, M.S., et al., *Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus*. *Virology*, 1988. **165**(1): p. 191-199.
63. De Moerlooze, L., et al., *Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region*. *J Gen Virol*, 1993. **74 (Pt 7)**: p. 1433-1438.
64. Vilcek, S., et al., *Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups*. *Arch Virol*, 2001. **146**(1): p. 99-115.
65. Vilcek, S., et al., *Molecular characterization of ovine pestiviruses*. *J Gen Virol*, 1997. **78 (Pt 4)**: p. 725-735.
66. Kuta, A., et al., *Predominance of bovine viral diarrhea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland*. *Vet Microbiol*, 2013. **166**(3-4): p. 639-644.
67. Yan, L., et al., *Combination of reverse transcription real-time polymerase chain reaction and antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of animals persistently infected with Bovine viral diarrhea virus*. *J Vet Diagn Invest*, 2011. **23**(1): p. 16-25.
68. Ridpath, J.F. and S.R. Bolin, *The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV*. *Virology*, 1995. **212**(1): p. 39-46.
69. Luzzago, C., et al., *Distribution pattern of bovine viral diarrhoea virus strains in intensive cattle herds in Italy*. *Vet Microbiol*, 2001. **83**(3): p. 265-274.
70. Topliff, C.L. and C.L. Kelling, *Virulence markers in the 5' untranslated region of genotype 2 bovine viral diarrhea virus isolates*. *Virology*, 1998. **250**(1): p. 164-172.
71. Jones, L.R., R. Zandomeni, and E.L. Weber, *Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from Argentina*. *Vet Microbiol*, 2001. **81**(4): p. 367-375.
72. Jenckel, M., et al., *Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhea virus detected by deep sequencing*. *J Virol*, 2014. **88**(12): p. 6983-6992.
73. Becher, P., et al., *Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep*. *Virology*, 1994. **198**(2): p. 542-551.

74. Ridpath, J.F. and S.R. Bolin, *Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses*. Virus Res, 1997. **50**(2): p. 237-243.
75. Becher, P., et al., *Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification*. Virology, 1999. **262**(1): p. 64-71.
76. Rasmussen, T.B., et al., *Generation of recombinant pestiviruses using a full-genome amplification strategy*. Vet Microbiol, 2010. **142**(1-2): p. 13-17.
77. Leskova, V., et al., *Genetic characterization of a border disease virus isolate originating from Slovakia*. Acta Virol, 2013. **57**(1): p. 17-25.
78. Vilcek, S., et al., *Complete genomic sequence of a border disease virus isolated from Pyrenean chamois*. Virus Res, 2010. **152**(1-2): p. 164-168.
79. Vilcek, S., et al., *Molecular characterization of border disease virus strain Aveyron*. Vet Microbiol, 2014. **171**(1-2): p. 87-92.
80. Dubois, E., et al., *Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006*. Vet Microbiol, 2008. **130**(1-2): p. 69-79.
81. Becher, P., et al., *Complete genome sequence of a novel pestivirus from sheep*. J Virol, 2012. **86**(20): p. 11412.
82. Peletto, S., et al., *A new genotype of border disease virus with implications for molecular diagnostics*. Arch Virol, 2016. **161**(2): p. 471-477.
83. NCBI. *GenBank*. 2019 [cited 2019 12/05/2019]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
84. LIRMM. *ClustalW 2.1*. 2019 [cited 2019 12/05/2019]; Available from: http://www.phylogeny.fr/one_task.cgi?task_type=clustalw.
85. LIRMM. *Gblocks*. 2019 [cited 2019 12/05/2019]; Available from: http://www.phylogeny.fr/one_task.cgi?task_type=gblocks.
86. Factor, C., et al., *Genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses from the Galicia region of Spain*. Vet Rec Open, 2016. **3**(1).
87. Aduriz, G., R. Atxaerandio, and N. Cortabarria, *First detection of bovine viral diarrhoea virus type 2 in cattle in Spain*. Vet Rec Open, 2015. **2**(1).
88. García-López, J., *Enfermedades respiratorias y digestivas de los terneros*. Ministerio de Agricultura y Pesca, 1981.
89. Diéguez, F., et al., *Variabilidad genética del virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) en Galicia*. Producción Animal, 2008. **239**: p. 4-7.
90. Esperón, F., et al., *Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in Spain between 2007 and 2015, spatial and temporal distribution*. XXIX World Buiatrics Congress (Dublin), 2016.

91. Jones, L.R., R. Zandomeni, and E.L. Weber, *Quasispecies in the 5' untranslated genomic region of bovine viral diarrhoea virus from a single individual*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 9): p. 2161-2168.
92. Decaro, N., et al., *Evidence for Circulation of Bovine Viral Diarrhoea Virus Type 2c in Ruminants in Southern Italy*. Transbound Emerg Dis, 2017. **64**(6): p. 1935-1944.
93. Donoso, A., et al., *Genetic diversity of Bovine Viral Diarrhea Virus from cattle in Chile between 2003 and 2007*. 2018. **14**(1): p. 314.
94. Fulton, R.W., et al., *Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease*. Can J Vet Res, 2002. **66**(3): p. 181-190.
95. Obando, C., et al., *Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela*. Acta Vet Scand, 1999. **40**(3): p. 253-262.
96. Elvira Partida, L., et al., *Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus 2 as the Cause of Abortion Outbreaks on Commercial Sheep Flocks*. Transbound Emerg Dis, 2017. **64**(1): p. 19-26.
97. Luzzago, C., et al., *Spatial and Temporal Phylogeny of Border Disease Virus in Pyrenean Chamois (*Rupicapra p. pyrenaica*)*. PLoS One, 2016. **11**(12).
98. Braun, U., et al., *Border disease in cattle*. Vet J, 2019. **246**: p. 12-20.
99. Valdazo-Gonzalez, B., M. Alvarez-Martinez, and I. Greiser-Wilke, *Genetic typing and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain*. Vet Microbiol, 2006. **117**(2-4): p. 141-153.