



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**“DIARREA VIRAL BOVINA: DESARROLLO DE NUEVA
HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA Y AVANCES EN LA
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS EN URUGUAY”**

MARA JIMENA OLMOS NOLI

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2022

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**“DIARREA VIRAL BOVINA: DESARROLLO DE NUEVA
HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA Y AVANCES EN LA
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS EN URUGUAY”**

MARA JIMENA OLMOS NOLI



Rodrigo Puentes
Director de Tesis



Laureana de Brun
Co-director



Rodney Colina
Co -director

2022

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Javier Panei; PhD

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata - Argentina

Aurea V. Flatschart; PhD

Instituto Nacional de Metrología, Calidad y Tecnología

INMETRO – Brasil

Andrés Cabrera; PhD

Facultad de Veterinaria

Universidad de la República - Uruguay



ACTA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: PRESENCIAL Y PLATAFORMA ZOOM, lunes
22/8/22

TRIBUNAL: Andrés Cabrera, Áurea Flatschart, Javier Panei

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4138382-3	OLMOS NOLI, MARA JIMENA	Aprobado	12

TRIBUNAL

FIRMA

Dr. Javier Panei

Dra. Aurea V Flatschart

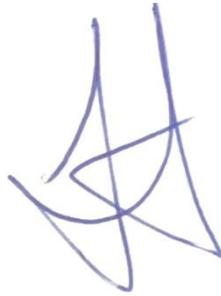
Dr. Andrés Cabrera

Montevideo, 22 de agosto de 2022.

En el día de la fecha se procede a la defensa de la tesis de maestría dentro del programa de Posgrado en Salud Animal titulada “DIARREA VIRAL BOVINA: DESARROLLO DE NUEVA HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA Y AVANCES EN LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS EN URUGUAY”, presentada por Mara Olmos. De la versión escrita y presentación oral se desprende un gran conocimiento del tema, así como un abordaje experimental que se destaca, acorde a los objetivos planteados en esta tesis.

Esta tesis, asimismo, aporta el desarrollo de una nueva herramienta molecular para el diagnóstico certero de una enfermedad de gran impacto en la producción nacional. Sumando nuevos datos epidemiológicos de la misma, este conjunto de nuevos conocimientos contribuirá con el manejo y prevención de la diarrea viral bovina en el país.

Por lo que antecede, este tribunal acuerda por unanimidad otorgar esta tesis la calificación de Aprobado con nota 12.



Dr. Javier Panei



Dra. Aurea V Flatschart



Dr. Andrés Cabrera

AGRADECIMIENTOS

“Cualquier momento es perfecto para aprender algo nuevo”

Albert Einstein

Esta tesis la he logrado gracias a la participación de muchas personas de alguna forma directa o indirecta.

A mis tutores Rodrigo y Laureana por darme la oportunidad e incentivar me desde el primer día en el proceso de formación y crecimiento. Lau, día a día en el laboratorio desde el comienzo de esta tesis siempre apoyando y brindándome sus conocimientos.

A la Unidad de Microbiología de Facultad de Veterinaria- UdelaR por permitirme realizar el trabajo de Laboratorio y a las compañeras/os: Leti, Vicky, Gabi, Carola, Flo R., Andrés, Eli L., Eli A, Vale B., Vale S., Fer B., Marcelo C, Silvana.

Al laboratorio de Virología Molecular, CENUR Litoral Norte-UdelaR, a Leticia Maya por el apoyo y colaboración en este trabajo y Rodney Colina por aceptar la participación en este trabajo.

A Victoria de Brun, por darme su tiempo, conocimiento y experiencia en parte del trabajo experimental. Al Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo animal (LEMA-Fvet), por el equipo utilizado para parte del trabajo experimental.

A mis hijos: Renzo y Valentina y a mi pareja Bruno por acompañarme, apoyarme e incentivar me día a día para continuar este proceso.

A mis padres: Gerardo y Mariella y mi hermana Sabrina y Andrés por ser mi apoyo incondicional, por los valores que me han transmitido, por cuidar a mis hijos y el cariño de siempre.

A toda mi familia y a mis amigas, a cada uno de ellos, que están siempre y de una forma u otra han ayudado a mi formación.

A mi amigo de Fvet, Álvaro G., por todo lo que he aprendido de él en estos años compartidos y a mis compañeros: Elena, Joaquín B, Ceci, Vale D que están día a día en el PAS.

A la Comisión Académica de Posgrado – UdelaR, por haberme brindado una beca de maestría.

A todos, gracias

ÍNDICE

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE	IV
DEFENSA DE TESIS	IV
RESUMEN	IV
SUMMARY	V
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación mundial de DVB	2
1.2 Situación en América Latina y en Uruguay	2
1.3 Virus de DVB: Agente Etiológico	3
1.4 Variabilidad genética de VDVB	4
1.5 Biotipos	5
1.6 Presentaciones de la enfermedad	6
1.7 Importancia del virus de la Diarrea Viral Bovina	9
1.8 Diagnóstico molecular de VDVB	10
1.8.1 <i>Droplet Digital</i> PCR (ddPCR)	10
1.9 Vacunación DVB	11
1.10 Control y erradicación	11
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVOS	13
4.1 OBJETIVO GENERAL	13
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1 Muestras controles y de campo utilizadas	14
5.2 Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADN complementario	14
5.3 Puesta a punto de la técnica PCR convencional	15
5.4 Puesta a punto de la técnica “ <i>Real time</i> PCR” (qPCR) con SYBR Green	15
5.5 Estandarización de la técnica “ <i>Droplet Digital</i> PCR” (ddPCR)	16
5.6 Ensayos <i>in vitro</i> utilizando leche descremada ultrapasteurizada (UHT)	16
5.7 Detección, secuenciación y análisis filogenético del VDVB en muestras de sueros de bovinos	17
5.8 Sensibilidad y especificidad de <i>Droplet Digital</i> PCR y <i>Real time</i> PCR	18
6. RESULTADOS	19
6.1 Puesta a punto de la técnica PCR convencional	19
6.1.2 Ensayo <i>in vitro</i> utilizando leche descremada ultrapasteurizada (UHT)	21

6.2 Análisis de la variabilidad genética de VDVB en Uruguay a partir de las muestras analizadas en el objetivo específico N°4.	22
6.3 “ <i>Real time PCR</i> ” (qPCR)	25
6.4 “ <i>Droplet Digital PCR</i> ” (ddPCR)	29
6.4.1 “ <i>Droplet Digital PCR</i> ” (ddPCR): Ensayo <i>in vitro</i> utilizando leche descremada ultrapasteurizada (UHT)	34
6.5 Análisis y resultados obtenidos comparando las tres técnicas moleculares de diagnóstico para DVB	36
6.6 Análisis estadístico	38
7. DISCUSIÓN	39
8. CONCLUSIONES	45
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	55

RESUMEN

La Diarrea Viral Bovina (DVB) es una enfermedad viral con un gran impacto negativo en la producción y reproducción del ganado bovino. Luego de la Fiebre aftosa, este es el virus que causa las pérdidas económicas más importantes en la producción bovina. El agente etiológico es un *Pestivirus* de la Familia *Flaviviridae*. Está distribuida ampliamente a nivel mundial con gran diseminación en los rebaños bovinos en la región, y la prevalencia oscila entre un 60 – 85%. Una característica relevante es la capacidad de producir animales inmunotolerantes (persistentemente infectados - PI) que muchas veces pasan desapercibidos y eliminan gran cantidad de virus al rodeo, siendo estos la primer y principal fuente de transmisión viral. Desde el punto de vista diagnóstico, lograr detectar al virus tempranamente en un rodeo permite establecer un programa de control más eficiente, ya que la aplicación de vacunas como principal medida de control está demostrado que no es suficiente en predios con animales PI. El objetivo de este trabajo de maestría fue por lo tanto comparar técnicas moleculares tradicionales (PCR convencional y *Real time* PCR) con una de última generación (*Droplet Digital* PCR – ddPCR), que ha demostrado presentar ventajas importantes sobre las primeras. Para esto, se utilizaron dos tipos de muestras (suero y leche contaminada artificialmente) de animales con diagnóstico previo de DVB por PCR convencional. Por otro lado, se analizaron las secuencias genéticas de los virus identificados, con el objetivo de contribuir al conocimiento de la variabilidad genética de DVB circulantes en el país. La ddPCR demostró tener mayor sensibilidad y precisión para la detección y cuantificación de DVB. El límite de detección de la técnica ddPCR utilizando la cepa de referencia NADL fue hasta 0,24 copias/ μ l en la dilución -6 ($286,3 \times 10^{-6}$ ng/ μ l) logrando detectar un orden más que las técnicas preexistentes. Los resultados demuestran que *Droplet Digital* PCR es una herramienta robusta para detectar el virus más precozmente en los rodeos, ya sea a nivel individual y de animales PI o en muestras colectivas de leche. Por otro parte, los resultados del análisis de las secuencias analizadas en este trabajo de tesis, fueron un total de 32, de las cuales 30 (94%) tienen mayor porcentaje de verosimilitud a las secuencias VDVB-1 y 2 (6%) a las secuencias de VDVB-2.

SUMMARY

Bovine Viral Diarrhea (BVD) is a viral disease with a great negative impact on the production and reproduction of cattle. After foot-and-mouth disease, this virus causes the most important economic losses in bovine production. The etiological agent is a virus of the family *Flaviviridae*, genus *Pestivirus*, and it is widely distributed worldwide with great dissemination in cattle herds in the region, the prevalence ranges between 60-85%. A relevant characteristic is the ability to produce immunotolerant animals (persistently infected - PI) that are not detected and they eliminate a large number of viruses in the herd, being these the first and main source of viral transmission. Early detection of the virus in the herd allows establishing a more efficient control program; moreover, since it has been shown that vaccination as the main control measure is insufficient in farms with PI animals. The objective of this master's thesis was to compare traditional molecular techniques (conventional PCR and *Real time* PCR) with one of the latest generation (*Droplet Digital* PCR – ddPCR), which has shown significant advantages over the first ones. For this, two types of samples (serum and milk) from animals previously diagnosed with BVD by conventional PCR were used. On the other hand, the genetic sequences of the identified viruses were analyzed, with the aim of contributing to the knowledge of the genetic variability of BVDV circulating in the country. ddPCR was shown to have higher sensitivity and precision for the detection and quantification of BVDV. The detection limit of the ddPCR technique using the NADL reference strain was up to 0,24 copies/ μ l ($286,3 \times 10^{-6}$ ng/ μ l), achieving to detect one order more than the pre-existing techniques. The results show that *Droplet Digital* PCR is a robust tool to detect the virus earlier in herds, either at the individual level and in PI animals or in collective milk samples. On the other hand, the results of the analysis of the sequences analyzed in this thesis work, were a total of 32, of which 30 (94%) have a higher probability percentage to the BVDV-1 sequences and 2 (6%) to the BVDV-2 sequences.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Imagen del genoma de VDVB. (Tautz et al., 2015).....	4
Figura 2. Principales manifestaciones clínicas reproductivas a partir de la infección con el virus de la Diarrea Viral Bovina.....	7
Figura 3. Esquema de las presentaciones de la enfermedad de DVB (Vargas et al., 2009)	8
Figura 4. Cartucho para 8 muestras donde se formarán las gotas para cada muestra en el equipo QX200 “Droplet Generator” (Bio-Rad #186-4002)..	16
Figura 5. Técnica PCR convencional utilizando diluciones del plásmido recombinante conteniendo el gen 5´UTR del virus de DVB.....	19
Figura 6. Técnica PCR convencional utilizando diluciones la cepa de referencia NADL-DVB (control positivo).....	20
Figura 7. Técnica PCR convencional utilizando la cepa de referencia NADL-DVB en leche y en agua DEPC.....	21
Figura 8. Árbol filogenético de secuencias del gen 5´UTR del genoma del virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB).	25
Figura 9. Puesta a punto de la técnica <i>Real time</i> PCR utilizando un plásmido recombinante conteniendo el gen 5´UTR del virus de DVB.....	26
Figura 10. Curva estándar de la técnica <i>Real time</i> PCR utilizando un plásmido recombinante conteniendo el gen 5´UTR del virus de DVB.....	26
Figura 11. Resultados obtenidos mediante técnica <i>Real time</i> PCR utilizando la cepa de referencia NADL-DVB	27
Figura 12. Curva de amplificación de muestras de suero bovino mediante <i>Real-time</i> PCR.	28
Figura 13. Curva de Melting de las muestras de suero bovino para detección de DVB mediante <i>Real time</i> PCR.....	28
Figura 14. Gotas generadas para la detección de VDVB mediante la técnica <i>Droplet Digital PCR</i> (ddPCR) utilizando la cepa de referencia NADL-DVB.	29

Figura 15. Resultados obtenidos para la detección de VDVB mediante <i>Droplet Digital PCR</i> (ddPCR) utilizando la cepa de referencia NADL-DVB.....	30
Figura 16. Número de copias/ μ l de la cepa de referencia NADL-DVB (control positivo) en diluciones seriadas en base 10 mediante <i>Droplet Digital PCR</i> (ddPCR).....	31
Figura 17. Límite de detección de la técnica <i>Droplet Digital PCR</i> utilizando diluciones del plásmido recombinante conteniendo el gen 5'UTR del virus de DVB	32
Figura 18. Resultados obtenidos por <i>Droplet Digital PCR</i> para una muestra de campo (animal persistentemente infectado).....	33
Figura 19. Resultados obtenidos por <i>Droplet Digital PCR</i> a partir de virus DVB cepa de referencia NADL-DVB en leche.	34
Figura 20. Resultados obtenidos por <i>Droplet Digital PCR</i> a partir de virus DVB cepa de referencia NADL-DVB en agua DEPC.....	35
Figura 21. Gráfica de regresión lineal de los resultados de cuantificación de VDVB mediante <i>Real time PCR</i> y <i>Droplet Digital PCR</i> . Los valores están expresados como \log_{10} n° copias/ μ l. Ecuación de regresión lineal: $y= 0,5391x - 1,1302$ y $R^2= 0,81$	36
Tabla 1. Planes de erradicación de DVB en distintos países. Pecora y Aguirreburualde 2017.	12
Tabla 2. Límites de detección de PCR convencional, <i>Real time PCR</i> y <i>Droplet Digital PCR</i> en muestras control de DVB y en ensayo contaminando leche artificialmente con DVB.....	37
Tabla 3. Resultados cualitativos (positivos y negativos) obtenidos del Virus de la Diarrea Viral Bovina mediante tres técnicas moleculares de diagnóstico: PCR convencional, <i>Real time PCR</i> y <i>Droplet Digital PCR</i> de muestras de suero bovino	38
Tabla 4. Comparación de resultados de <i>Droplet Digital PCR</i> y <i>Real time PCR</i> . Se muestran los datos de: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) con un nivel de confianza del 95%	38

1. INTRODUCCIÓN

La Diarrea Viral Bovina (DVB) es una enfermedad frecuente que afecta al ganado bovino y es causada por el virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) (Lanyon et al., 2014; Ridpath, 2010; S. Vilček et al., 1994).

Es una enfermedad endémica que causa grandes pérdidas económicas por la variedad de manifestaciones clínicas que produce. La patogénesis de la enfermedad es compleja, con infección pre y post gestacional (Flores et al., 2002).

La infección durante la gestación lleva a la muerte embrionaria, efectos teratogénicos o el nacimiento de terneros PI (persistentemente infectados). Estos últimos son la principal fuente de transmisión del virus por secreciones o excreciones (Lanyon et al., 2014). Desde hace mucho tiempo está demostrado que DVB afecta la producción y performance reproductiva del animal, y a pesar de eso las pérdidas económicas directas e indirectas que ocasiona no han sido descritas aún en Uruguay. Sin embargo, en otros países como Holanda se ha calculado que la disminución en la producción de leche produce pérdidas de 0,08 kg/vaca por día en rodeos con presencia de DVB (Yue et al., 2021) y pérdidas económicas de 2 a 625 euros por vaca por año según Richter et al. (2017).

Las pérdidas anuales calculadas por DVB en Dinamarca son de 17 millones de dólares, mientras que los costos totales de programas de control – erradicación para 3 años incluyendo seguimiento y testeo de animales se aproximan a 27 millones de dólares (Bitsch & Rønsholt, 1995).

En Nueva Zelanda se estiman pérdidas de USD 55,76 por vaca/año en los rebaños lecheros afectados y pérdidas superiores a los USD 28,20 en la industria láctea neozelandesa, en base a un 14,6% de rebaños afectados (Heuer et al., 2007).

La circulación del virus en Uruguay es desde los 80', pero fue confirmado su diagnóstico por primera vez en 1996 por técnicas inmunohistoquímicas (Saizar & Gil, 1998).

Se ha estimado la seroprevalencia de DVB en Uruguay, siendo entre un 97-100% en establecimientos y un 60-72% a nivel individual (Repiso et al., 2005). Un relevamiento de datos de seroprevalencia más actual estima que, a partir de 521 establecimientos de carne y 103 lecheros seleccionados al azar donde se muestrearon 60 vacas de cría de cada uno, se obtuvieron los siguientes resultados: seroprevalencia predial de 98,8 +- 1,1% (IC 96,6-100%) y seroprevalencia individual de 80,9% +-3,1% (IC 74,7-87,0%) (Macchi et al., 2018).

En nuestro país, el primer estudio que describe la distribución de subgenotipos fue en el año 2016, donde el 92,7% de las cepas fueron VDVB-1 y el 7,1% fueron VDVB-2 (Maya et al., 2016a).

Actualmente Uruguay no cuenta con programas de control o erradicación de esta enfermedad y puede que exista un subdiagnóstico dado que se limita a la remisión de muestras por parte de los productores por abortos o problemas reproductivos en los rodeos.

1.1 Situación mundial de DVB

Es una enfermedad endémica a nivel mundial que actualmente preocupa a gran cantidad de países en el mundo y hay diferentes realidades. En muchos países no hay políticas claras frente a esta enfermedad y en otros hay planes de erradicación voluntarios u obligatorios (Lanyon et al., 2014).

La DVB es una de las enfermedades de mayor distribución en la población bovina y su prevalencia depende del tipo de ganado, densidad poblacional, tipo de manejo, comercio de animales, manejo de pasturas, etc (Rivera G., 2012).

Houe (1999, 1995), considera una prevalencia mundial de DVB de 60 – 85% y de 1-2% de animales PI; por otro lado en los países escandinavos se determinó que la prevalencia viral estuvo asociada a la densidad de la población inicial de bovinos y al tamaño del rodeo (Houe & Meyling, 1991). Esto coincide con Vargas et al., 2012 que afirma que la prevalencia de DVB es alta a nivel mundial y los estudios serológicos evidencian una prevalencia que oscila entre un 45-90%. En Suecia, el 60% de ganado es seropositivo y se estima un 0,7% de animales PI, manteniéndose hace 30 años aproximadamente estos valores (Bachofen et al., 2010).

En Europa existe una asociación de países (Bélgica, Francia, Alemania, Italia, Holanda, Irlanda, Polonia, España y Reino Unido) junto a una compañía farmacéutica líder en el mundo, que están trabajando en conjunto para lograr llegar a “BVD zero”, planteando una plataforma virtual (<https://www.bvdzero.com/>) donde se aporta información científica actualizada de prevalencia de genotipos del virus de DVB, estatus de los diferentes países, diagnóstico, planes de control/erradicación de la enfermedad y se plantean proyectos para casos reales de problemas en establecimientos con DVB.

Por otra parte, y desde los años 90’, en países como Noruega, Finlandia y Suecia se comenzó un programa de control-erradicación de DVB utilizando técnicas de ELISA para detectar anticuerpos en leche de tanque como primera etapa de identificación de rodeos infectados con este virus. Es de destacar que ningún rodeo fue encontrado libre de DVB. Actualmente, algunos países cuentan con programas de erradicación para DVB (Ridpath, 2010) y otros han logrado erradicarla (H. Houe et al., 2006; Presi et al., 2011).

En Suecia, por ejemplo, el programa de erradicación es obligatorio y se ha logrado disminuir la prevalencia de PI de un 1,4 a 0,02%. Generalmente para estimar la prevalencia en estos casos, se han utilizado técnicas de detección de anticuerpos en muestras de leche de tanque o muestras de suero (Machado et al., 2016).

1.2 Situación en América Latina y en Uruguay

En Argentina y Brasil han sido reportados los primeros casos en los años 60’, pero los primeros aislamientos del virus se lograron en los años 1974 en Brasil, 1984 en Argentina, 1985 en Chile y 1981 en Colombia (Rweyemamu et al., 1990). En Perú, recientemente la seroprevalencia de 460 animales muestreado fue de un 64%; y el sexo (hembra) y la categoría zootécnica (vaca) mostraron asociaciones significativas en los niveles de anticuerpos contra DVB (Arbulú-García & Morales-Cauti, 2021).

En Uruguay, el virus de DVB circula al menos desde los 80', pero fue confirmado su diagnóstico por primera vez en 1996 por técnicas inmunohistoquímicas (Saizar & Gil, 1998).

A partir de esa fecha, existen diversos estudios serológicos, tanto en ganado de carne como de leche, que han estimado la prevalencia de DVB en nuestro país; siendo entre un 97-100% en establecimientos y un 60-72% a nivel individual (Mederos & Hirigoyen, 1997; Saizar & Gil, 1998, Nuñez et al., 2000; Repiso et al., 2005).

En el año 2016, Maya et al. (2016), publicaron la primera caracterización genética del virus de DVB en Uruguay. A partir de muestras de suero de 390 animales de 14 rodeos de Tacuarembó, Rivera y Florida con problemas reproductivos, se realizó en una primera etapa ELISA por captura de antígeno y luego *Real time* PCR. Los resultados mostraron que 16 de los animales fueron positivos por ambas técnicas (4,1%).

Por otra parte, en resultados obtenidos por nuestro grupo, sobre la prevalencia serológica de diferentes enfermedades reproductivas (entre ellas DVB) utilizando la técnica de Seroneutralización *in vitro* (SN), se observó que 651/655 muestras fueron seropositivas (99,39%) (Mionetto & Rodriguez, 2018).

Finalmente, y más recientemente, en un muestreo desde 2016 – 2018 en Dptos. de Colonia, Río Negro y Soriano, se estudiaron 6 brotes de animales con manifestaciones clínicas compatibles con DVB y partir de ellos, se analizaron 8 casos realizando necropsia, histopatología (IHC) y *Real time* PCR a partir de suero o tejidos (da Silva Silveira et al., 2020). Los resultados muestran que BVDV-1a, fue el subtipo más encontrado (brotes 1, 2, 4 y 5) y fue asociado con enfermedad y muerte del ganado; lo que también coincide con Maya et al. (2016). También se encuentra el subtipo BVDV-2b en ambos trabajos realizados en Uruguay.

1.3 Virus de DVB: Agente Etiológico

El virus de DVB forma parte del género *Pestivirus* dentro de la Familia *Flaviviridae*. Se reconocen tres especies dentro del género *Pestivirus*: el VDVB, el virus de la enfermedad de *Border* que afectan principalmente a los ovinos; y el virus de la Peste Porcina Clásica (PPC) que afecta principalmente a los suinos. La PPC ha sido erradicada de EEUU y Canadá, mientras que las otras dos se mantienen de forma endémica a nivel mundial (Ridpath & Bolin, 1998). El genoma está constituido por una cadena simple de ARN de polaridad positiva y consta de 4400 nucleótidos con un peso molecular de 12.0 a 12.5 kilodáltons (Huaman G. Juan, 2006).

El genoma codifica dos glicoproteínas asociadas a la envoltura, la E1 y E2; además de una glicoproteína extra de envoltura E^{erns}, una ARNasa que posee *in vitro* un efecto inmunosupresivo, citotóxico y apoptótico para los linfocitos bovinos (Bruschke et al., 1997).

Las proteínas estructurales se codifican en el extremo 5', en el primer tercio del genoma, las no estructurales (a excepción de la proteína N^{pro}/p20 que se codifica también en el primer tercio) se codifican en los tercios restantes hacia el extremo 3' (Fig.1).

Los extremos 3' y 5' del genoma están rodeados por regiones no traducidas (UTR) (Meyers & Thiel, 1996; Robesova et al., 2009). Diferentes regiones del genoma del virus de DVB han sido utilizadas para estudiar la diversidad genética y evolutiva del virus, incluyendo la región 5'UTR, la glicoproteína E2, auto proteasa N^{pro} y proteasa NS3 (Gollán et al., 2006; Maya et al., 2016b).

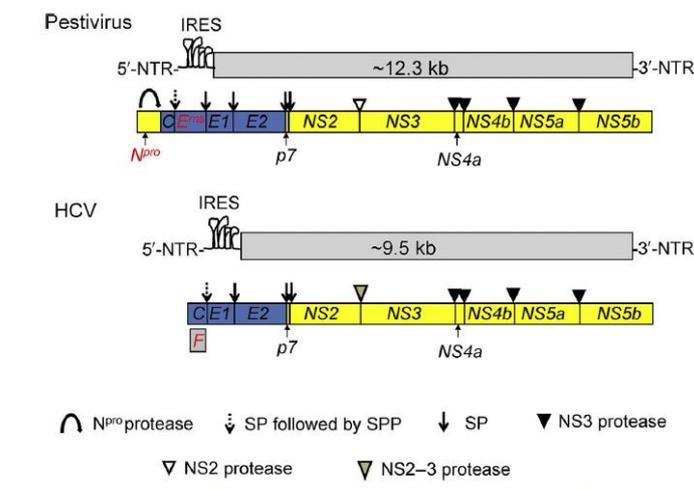


Figura 1. Imagen del genoma de VDVB. (Tautz et al., 2015).

1.4 Variabilidad genética de VDVB

Los mecanismos más frecuentes para generar variabilidad genética son la mutación y la recombinación. La mutación es un mecanismo clave en la generación de variación genética en los virus cuyo genoma está constituido por ARN. Ésta, es la responsable del gran número de variantes virales en una infección (Bartenschlager & Volker, 2000). Algunas variantes sobreviven generando una suma de variantes diferentes en un mismo hospedero infectado, a este conjunto de variantes genéticas estrechamente relacionadas se le denomina cuasiespecies virales (Eigen et al., 1981).

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), comprende 3 especies virales que afectan al ganado, denominadas: *Pestivirus A* (BVDV-1), *Pestivirus B* (BVDV-2) y *Pestivirus H* (HoBi-like virus, HoBi-PeV) (de Oliveira et al., 2021; ICTV, 2021).

Actualmente 21 subtipos de BVDV-1 (a-u), 4 subtipos de BVDV-2 (a-d) y 4 subtipos de HoBi-like virus (a-d) han sido identificados basados principalmente en el análisis de las regiones 5'UTR, N^{pro} y E2 (Nagai et al., 2004; Ridpath et al., 1994; Š. Vilček et al., 2001; Yeşilbağ et al., 2017).

HoBi-like virus presenta manifestaciones clínicas similares a las observadas por BVDV-1 y BVDV-2 (Bauermann et al., 2012; Liu et al., 2009; Schirrmeier et al., 2004).

En un estudio exhaustivo a nivel internacional sobre la variabilidad y distribución global de subgenotipos de VBDV realizado por Yeşilbağ et al. (2017), se demostró que la distribución de VDVB-1 es significativamente más amplia que VDVB-2 a nivel mundial. En cuanto a los subgenotipos, la investigación confirma que VDVB-1b es el predominante principalmente en las Américas, Asia y Europa, seguido del VDVB-1a y VDVB-1c.

En relación a las Américas, el genotipo VDVB-1 es el más frecuente en Uruguay y Argentina, mientras que en Brasil y Chile VDVB-1 y VDVB-2 están distribuidos en igual frecuencia (Maya et al., 2016b). En Chile y en Argentina VDVB-1b es el subgenotipo predominante respecto a VDVB-1a y VDVB-1c, ambos encontrados en esos países (Pizarro-Lucero et al., 2006).

Con respecto a el *Pestivirus* HoBi-like virus, se ha encontrado únicamente en los países de Brasil (Dias et al., 2017) y Argentina (Pecora et al., 2017).

En nuestro país, el primer estudio que describe la distribución de subgenotipos fue en el año 2016, donde el 92,7% (13/14) de las cepas fueron VDVB-1 y el 7,1% (1/14) fue VDVB-2. La mayoría de los VDVB-1 se encontraron el mismo clúster en el estudio filogenético de VDVB-1a y a su vez con alta similitud a las cepas brasileras (Maya et al., 2016b).

1.5 Biotipos

Por otro lado, según las manifestaciones que se producen a nivel de cultivos celulares, el virus de DVB se divide en citopático (cp) o no citopático (ncp). Los biotipos citopáticos son los que producen apoptosis a nivel celular, mientras que los no citopáticos no producen ningún tipo de cambio en el cultivo celular (Gamlen et al., 2010).

El biotipo ncp, que no causa daños observables *in vitro*, se aísla generalmente en casos de infección aguda y está presente en todos los animales persistentemente infectados (PI) (Paton, 1995; Ridpath, 2003). El biotipo cp causa lesiones en cultivos celulares y surge del biotipo ncp por recombinaciones con el ARN de la célula hospedadora o con otros virus.

Estudios genéticos han demostrado que las mutaciones y rearrreglos dentro la región que codifica para la proteína no estructural p125 (p54/p80), están relacionados con la conversión del virus de DVB ncp a cp (Gollán et al., 2006).

Se ha encontrado una diferencia entre el biotipo cp y el ncp en el procesamiento (o traducción) del gen NS23. Sólo las cepas cp producen un fragmento de menor tamaño de NS3 (p80) por un clivaje proteolítico alterado de NS23 (Paton, 1995).

Debido a esto, ambos tipos son molecularmente diferentes, aunque inmunológicamente similares (Gollán et al., 2006; Paton, 1995; Ridpath, 2003).

1.6 Presentaciones de la enfermedad

Debido a la diversidad en sus propiedades genéticas y antigénicas del virus, las manifestaciones clínicas son muy diferentes y podemos distinguir cuatro tipos: infección aguda, infección grave, persistentemente infectados (PI) y la enfermedad de las mucosas (EM).

Generalmente, las cepas ncp parecen ser la causa de las infecciones agudas y se transmiten por secreciones nasales, orina, leche, semen, saliva, lágrimas y fluidos fetales (Meyling et al., 1990). Las cepas cp se ha visto que producen infección, pero solo bajo forma experimental. La fuente de infección más importante, sin embargo, son las cepas ncp en los terneros PI que se describirán más adelante.

El virus tiene receptores CD46 en macrófagos y linfocitos por donde ingresa la enfermedad (Maurer et al., 2004). Una vez infectado el animal, hay una viremia de 10-14 días acompañada de linfopenia, apoptosis en el Timo, pirexia y diarrea. A los 6 días post infección ya hay apoptosis de linfocitos, que junto a la inhibición de la actividad fagocítica de los macrófagos por inactivación de la caspasa-9 en linfonodos, lleva a una marcada disminución de la capacidad del sistema inmune de responder a otras infecciones (Marshall et al., 1996; Pedrera et al., 2012).

Esta inmunosupresión permite la entrada de otros agentes infecciosos al animal; por ejemplo se acentúan las enfermedades respiratorias y se han estudiado co- infecciones de DVB con *Neospora caninum* (Quinn et al., 2004). En feed-lot es considerado un factor de riesgo para la aparición de las enfermedades respiratorias (Barcuh, 2020).

Los animales pueden presentar cuadros de diarrea (Brownlie et al., 1998) y las enfermedades respiratorias son exacerbadas con la infección del virus de DVB (Fulton et al., 2000).

Con respecto a los efectos en la fertilidad, hay reducción de la concepción, muerte embrionaria temprana, abortos y defectos congénitos (McGowan et al., 1993; Sprecher et al., 1991). En toros y terneros se ha asociado la infección con DVB a hipoplasia testicular. La inseminación con semen de toros PI (seronegativos) puede transmitir el virus de DVB y afectar la fertilidad (Borel et al., 2007). Durante la infección fetal, se produce muerte embrionaria a partir del día 29 post concepción (McGowan et al., 1993). El nacimiento de un ternero PI se da por la infección entre los días 25 a 90 de gestación (Brownlie et al., 1998; Grooms, 2004). A partir de los 80 días de gestación en adelante puede causar efectos teratogénicos en el feto: atrofia cerebral, braquignatismo, retardo en el crecimiento pulmonar, entre otros (Fig. 2).

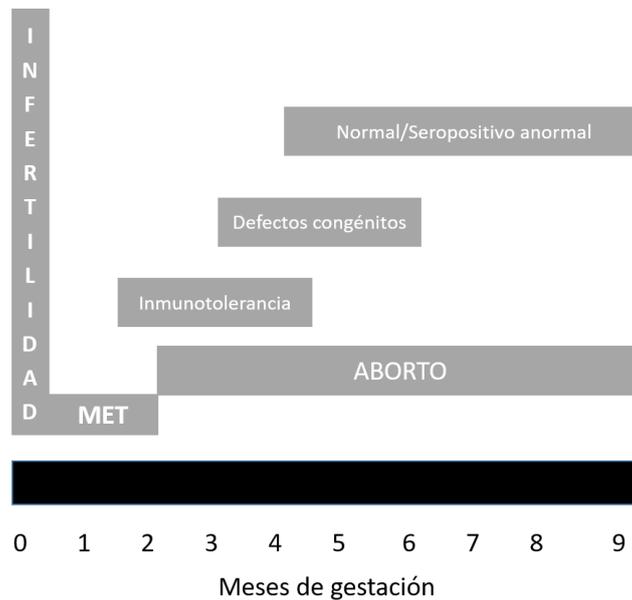


Figura 2. Principales manifestaciones clínicas reproductivas a partir de la infección con el virus de la Diarrea Viral Bovina. MET: muerte embrionaria temprana (adaptado de Grooms.,2004)

En los animales PI, el virus se distribuye en linfonodos, epitelio gastrointestinal, células linfocíticas, piel timo y cerebro (Liebler-Tenorio et al., 2004).

Pueden ser animales aparentemente sanos o tener pelo hirsuto, retardo en el crecimiento, o débiles. Además, por tener un sistema inmune debilitado son susceptibles a contraer otras enfermedades. La prevalencia de los animales PI oscila entre un 1 – 2 % en las poblaciones bovinas (Houe, 1999; Reinhardt et al., 2003). Esto, junto a la enfermedad de las mucosas, lleva a que estos animales no sobrepasen los 2 años de edad (Booth & Brownlie, 2012).

La Enfermedad de las Mucosas (EM), únicamente se produce en animales PI y es inexorablemente fatal. Se produce por una mutación de la cepa ncp circulante en el animal, a una cepa cp, causante de esta sobreinfección. Esta cepa cp inhibe la presentación de antígenos a las células T y promueve, a su vez, la diferenciación y activación de los monocitos; llevando a un descontrol en la inflamación y aumenta la viremia (Fig. 3).

En un trabajo de investigación observaron que terneros menores a 7 meses tienden más a padecer infecciones respiratorias y los mayores a 7 meses de edad desarrollan enfermedades a nivel de la mucosa entérica (Bachofen et al., 2010).

La EM se caracteriza por hipertermia, depresión, diarrea, lesiones erosivas a nivel de mucosas del tracto respiratorio y digestivo, estomatitis, formación de úlceras y necrosis en encías y espacio interdental, que en primeras etapas puede confundirse con Fiebre Aftosa (Repiso et al., 2005).

El biotipo cp de VDVB expresa una proteasa NS3, que produce apoptosis celular y se activan también otros factores como TNF- alfa (factor de necrosis tumoral) que también participa en la apoptosis. Estos cambios celulares ocurren principalmente a nivel de las Placas de Peyer llevando a atrofia y desaparición de las microvellosidades (Lanyon et

al., 2014). El intestino esta dilatado, por acumulación de mucus en las criptas de las glándulas intestinales. Todo esto lleva a una gran deshidratación y diarrea; y erosiones e inflamación de las mucosas de todo el animal visibles a simple vista.

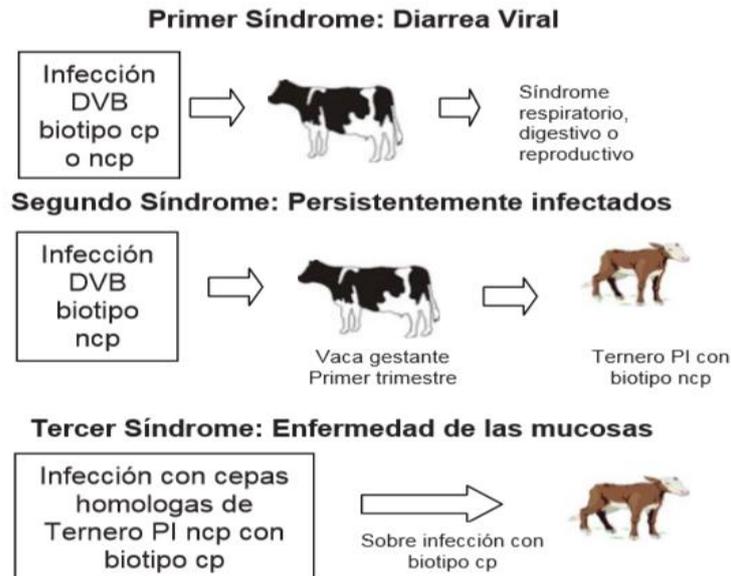


Figura 3. Esquema de las presentaciones de la enfermedad de DVB (Vargas et al., 2009)

1.7 Importancia del virus de la Diarrea Viral Bovina

Esta enfermedad está distribuida mundialmente y es una de las enfermedades virales presentes en el ganado bovino en Uruguay, es la más importante en ganadería de carne y junto con el virus de la Leucosis bovina, en ganado de leche. Debido a que la infección con el virus de DVB tiene un impacto económico significativo, asociado a los efectos reproductivos e inmunosupresivos, los programas de control y erradicación se han vuelto más comunes en el ganado bovino (Lanyon & Reichel, 2014).

A pesar de existir una seroprevalencia de 67,4% a nivel predial y prácticamente el 100% del rebaño con animales seropositivos en el país (Repiso et al., 2005), pocas veces se detecta el virus en los rodeos tanto de carne como de leche, por lo que se observa que existe un problema diagnóstico viral y se desconoce el impacto del mismo a nivel nacional.

La ecología del virus de DVB está influenciada por el sistema de alimentación, la higiene del animal y las políticas locales, y por esta razón no existe una única intervención de control efectiva que se pueda utilizar mundialmente (Isoda et al., 2019). Debido a la complicada patogénesis de la infección con DVB, el diagnóstico de laboratorio es un importante componente en la prevención y el control de la enfermedad (Burbano et al., 2006). Lograr detectar al virus tempranamente en un rodeo permite establecer un programa de control más eficiente, ya que la aplicación de vacunas como principal medida de control está demostrado que no es suficiente en predios con animales PI (Newcomer et al., 2017; Otonel et al., 2014).

Las pruebas diagnósticas moleculares detectan directamente el ARN genómico viral, esto tiene ventajas sobre el aislamiento viral debido a que no presentan interferencias con anticuerpos neutralizantes y así no se ve afectada la sensibilidad y especificidad de la prueba.

También es importante contar con técnicas diagnósticas de precisión para lograr detectar bajas cargas virales como por ejemplo en matrices como el Suero Fetal Bovino (SFB). El control de calidad de las líneas celulares que se utilizan en el laboratorio tiene gran importancia para brindar seguridad a los usuarios. El virus de DVB es un agente infeccioso muy asociado a la contaminación durante manipulación de muestras animales como SFB y albúmina, y además porque las cepas ncp no producen cambios a nivel celular (Flatschart et al., 2013).

1.8 Diagnóstico molecular de VDVB

Durante los últimos 10 años, la técnica *Real time* PCR ha sido ampliamente utilizada como diagnóstico de rutina de VDVB a nivel mundial y ha sido utilizada en numerosas muestras clínicas que incluyen: suero, sangre, tejidos, fluidos fetales, leche e hisopado nasal (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017). Algunos investigadores han realizado “pools” de muestras de sueros, leche o muestras de muecas de la oreja utilizando *Real time* PCR para realizar un “*screening*” del rodeo. Si éste resulta positivo, se implementa una PCR de cada muestra individual para obtener cada animal positivo. El “pool” de muestras es muy útil ya que da un mapeo inicial y rápido y efectivo como *screening* de animales PI en los rodeos (Kennedy, 2006). Sin embargo, en este tipo de estrategias, es fundamental contar con técnicas de alta sensibilidad ya que la muestra positiva puede estar muy diluida, posibilitando un resultado falso negativo.

1.8.1 Droplet Digital PCR (ddPCR)

Droplet digital PCR (ddPCR) es una novedosa técnica molecular de tercera generación que permite la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos “molde” o “objetivo” en una muestra, sin la necesidad de realizar curvas de calibración (Wu et al., 2017).

ddPCR ha sido utilizado en numerosas investigaciones con diferente aplicabilidad práctica con respecto a diagnóstico molecular como: detección de mutaciones (Beaver et al., 2015), detección de variación del número de copias (CNV's) (Olsson et al., 2016), diagnóstico viral (Abachin et al., 2018; Jones et al., 2014; Wu et al., 2017) y para estudios de cáncer (Alikian et al., 2017; Beaver et al., 2015).

Las mayores ventajas de esta técnica son: brindar una cuantificación absoluta de la muestra, tiene alta reproducibilidad; no necesita realizar curvas de calibración, menor sensibilidad a contaminantes, por lo tanto, se pueden utilizar diferentes matrices como muestras de estudio.

Esta técnica implica combinar la subpartición de la muestra en miles de “gotas”, la realización de una PCR tiempo final pero utilizando alguna marcación fluorescente y posteriormente la estadística de *Poisson* para realizar la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos “molde” en una muestra (Hindson et al., 2011). El experimento calcula cuántas veces “x” de un evento hay, en determinado intervalo de tiempo o volumen. La distribución de *Poisson* transforma una distribución aleatoria en una distribución uniforme. El volumen conocido de las gotas junto a la proporción de eventos positivos relativos al total del número de gotas de la muestra son utilizados para estimar la concentración de ADN molde en la muestra inicial aplicando una corrección por *Poisson* (Olmedillas-López et al., 2017).

En otras palabras y más precisamente, en la ddPCR la muestra se subdivide en múltiples gotas de aceite dentro de cada reacción (tubo) y donde algunas gotas tendrán una o más copias del ADN molde, y otras no tendrán ninguna copia. Al finalizar la fase de amplificación donde se llega a la fase “*plateau*” de la PCR, las gotas con fluorescencia

por encima del “threshold” serán asignadas como positivas dándoles el valor de 1 (uno) y las gotas con fluorescencia por debajo del “threshold” serán asignadas como negativas dándoles el valor de 0 (cero). Esto brinda el nombre a esta técnica por la metodología de combinación de 0 y 1 (*Digital*) (Abachin et al., 2018).

1.9 Vacunación DVB

Las vacunas para DVB se encuentran comercialmente disponibles para la prevención en Uruguay de esta enfermedad. En nuestro país por una comunicación de la Dirección General de MGAP se exige que las vacunas reproductivas sean inactivadas (Com. Pers. Vitale, Edgardo). En Argentina también está prohibido el uso de vacunas con virus vivo (INTA, 2018). Las vacunas con virus inactivado proporcionan una protección parcial, a diferencia de las vacunas a virus vivo modificado que se utilizan en otros países, incluyendo países de América del sur como Brasil (Gottems, 2018).

En nuestro país contamos con diversidad de vacunas reproductivas de diferentes laboratorios donde la DVB se encuentra en conjunto con otras enfermedades reproductivas (Urse, 2016).

Algunas experiencias de vacunación a largo plazo como la realizada por Littledike et al. (1993) en Nebraska (EEUU), implementando un programa de vacunación en un rodeo de animales durante 7 años, no consiguieron eliminar definitivamente la generación de animales PI, a pesar de las madres estar vacunadas. Según los autores, la infección se producía naturalmente con variantes antigénicas del virus de DVB. En ese sentido, varios autores afirman que la aplicación de vacunas como una única herramienta por sí sola no es suficiente como medida de control en rodeos con PI (Newcomer et al., 2017; Otonel et al., 2014). A su vez, investigaciones recientes en Argentina han desarrollado una versión mejorada de la vacuna, donde una subunidad del genoma está insertado en un vector viral (Baculovirus), basado en la glicoproteína E2 fusionado a una cadena simple de anticuerpos dirigidos a las células presentadoras de antígeno (INTA, 2018).

1.10 Control y erradicación

En varias regiones del mundo se han iniciado planes de erradicación que en algunos casos han funcionado y en otros aún están en desarrollo (Tabla 1). Algunos países cuentan con programas de erradicación para DVB (Ridpath, 2010) y otros han logrado erradicarla (Houe et al., 2006; Presi et al., 2011).

Estos planes, en algunos casos voluntarios y en otros obligatorios se basan en la eliminación de animales PI acompañado o no de vacunación según el caso.

La detección y eliminación de animales PI es fundamental para el control de DVB. Las técnicas que pueden emplearse fueron mencionadas en el punto 2.8 y se pueden utilizar como muestras: sangre, suero, semen, hisopado nasal u ocular o tejido de oreja.

Luego de la primera toma de muestra, el resultado puede ser positivo y no tratarse de un animal PI, sino ser una infección aguda producida recientemente. Por lo que se recomienda realizar otra determinación a las 3 -4 semanas posteriores para poder

confirmar o descartar la infección persistente. Si la segunda también es positiva, entonces es animal PI (Pecora, Andrea & Perez A., 2017).

La bioseguridad en los establecimientos es fundamental para lograr el control de esta enfermedad en los rodeos. Cuando ingresa un animal a un rodeo, se debe realizar diagnóstico de DVB. Asimismo, hay que prestar especial atención a la convivencia de los bovinos con otras especies animales, como ovejas cabras, ciervos, búfalos, cerdos que pueden ser reservorios de VDVB en particular y de otros *Pestivirus* (Rodríguez-Prieto et al., 2016).

Durante el manejo de tecnologías reproductivas, no habría que desestimar la posibilidad de la existencia de VDVB. Este virus al igual que los demás *Pestivirus*, es un contaminante muy común de productos biológicos como suero fetal bovino no irradiado, utilizado comúnmente en técnicas de laboratorio y producción de vacunas. El semen también puede ser fuente de diseminación de VDVB, por lo cual habría que analizarlo antes de la inseminación (Pecora et al., 2017).

En el sur de Inglaterra, entre los años 2006 a 2009 se realizó un programa piloto de erradicación de DVB, donde se testearon 11 mil animales. En una primera etapa se hizo un *screening* con muestras de sangre a los bovinos de entre 6 – 18 meses de edad (mediante ELISA) y muestra de leche de tanque (mediante ELISA y PCR). Al finalizar todas las rondas de tests, 2 establecimientos que aparentaban ser DVB-free dieron positivo y en total se identificaron 61 animales PI. De este trabajo de investigación concluyen que, para lograr la erradicación de la DVB, es muy importante contar con un sistema riguroso de bioseguridad, ya que la infección generalmente se da al comprar ganado y no implementar tests ni cuarentena (Booth & Brownlie, 2012).

Tabla 1. Planes de erradicación de DVB en distintos países. Pecora y Aguirreburualde 2017.

País	Inicio del plan	Estatus actual	Reintroducciones
Finlandia	1994 (voluntario)	Erradicado	No reportado
Noruega	1993 (voluntario)	Erradicado	No reportado
	2001 (obligatorio)		
Suecia	1993 (voluntario)	Erradicado	3 brotes: 2010-2011
	2002 (obligatorio)		
Dinamarca	1994 (voluntario)	Erradicado	2 brotes: 2013
	1996 (voluntario*)		
Austria	1997 (voluntario)	Erradicado	#
	2004 (obligatorio)		
Suiza	2008 (obligatorio)	Erradicado	Brote: 2014
Alemania	2011 (obligatorio)	-	#
Escocia e Irlanda	2011-2012 (voluntario)	-	#
	2012-2013 (obligatorio)		
Francia	(Voluntario)	-	#
Holanda	(Voluntario)	-	#
Bélgica	2012 (voluntario)	-	#
	2015 (obligatorio)		

El objetivo de esta tesis, es contribuir a mejorar el diagnóstico de la infección en los rodeos, que permita en conjunto con otras medidas, establecer programas de control más eficientes que los actualmente existentes.

Se busca profundizar la investigación existente en cuanto a la circulación viral en el país y analizar la capacidad de una nueva herramienta molecular, que podría ser clave en programas de control del virus a nivel poblacional fundamentalmente, ya sea con pools de sueros o muestras de leche de tanque. Según el desempeño de la ddPCR en términos de sensibilidad y precisión en relación a las PCR existentes, esta estrategia podría en un futuro permitir bajar los costos diagnósticos y hacer posible, programas de control más accesibles sin alterar la capacidad diagnóstica del virus en el rodeo.

3. HIPÓTESIS

3.1 La técnica *Droplet Digital* PCR es una herramienta molecular con mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad que las técnicas existentes para el diagnóstico y cuantificación del virus de la Diarrea viral bovina.

3.2 Los genotipos virales de DVB detectados en las muestras estudiadas en esta tesis, se relacionan con los genotipos virales detectados anteriormente en el país.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica de *Droplet Digital* PCR para la detección y cuantificación del virus de la Diarrea viral bovina y describir los genotipos virales circulantes en el muestreo realizado.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar las técnicas de PCR convencional, “*Droplet Digital* PCR” (ddPCR) y Real time PCR (qPCR) para la detección y cuantificación del virus de la diarrea viral bovina (VDVB).
2. Determinar la sensibilidad y especificidad analítica, así como la correlación y precisión entre las técnicas mencionadas, a partir de muestras controles.
3. Evaluar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la ddPCR en muestras de sueros de animales infectados naturalmente y de leches infectadas artificialmente con el virus.
4. Evaluar la filogenia de VDVB a partir de la región 5'UTR de su genoma, de las muestras de suero bovino analizadas en este estudio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras controles y de campo utilizadas

Se utilizó una cepa de referencia del virus de DVB (cepa NADL) que fue propagada en células MDBK como control positivo. A su vez, para la puesta a punto de las tres técnicas moleculares se utilizó el plásmido Pjet 1,2 (Acc number EF694056) de 2974 pares de bases (pDNA/15 K) gentilmente cedido por el laboratorio de Virología de CENUR Litoral Norte. La construcción del plásmido recombinante fue realizada utilizando el producto de PCR de la región 5'UTR del genoma de VDVB (amplicón de 207 pb).

Se calculó el número de copias (teóricas) que tenía el plásmido en base a la fórmula: número de copias = ([concentración del plásmido] x 6,022x10E23) / (largo en pares de bases x 1x10E9 x 660). Luego se hicieron diluciones seriadas para obtener número de copias/ μ l desde 1×10^7 a 1×10^1 .

Por otra parte, se utilizó leche comercial ultra pasteurizada para los ensayos *in vitro* con esta matriz. Como control negativo, se utilizaron sueros de otras especies no relacionadas a DVB (suero equino, suero felino) y se utilizó agua tratada con dietilpirocarbonato y libre de nucleasas (ADNasa y ARNasa) como NTC (*no template control*) para evitar falsos negativos en todos los ensayos realizados.

Las muestras de campo utilizadas fueron un banco de 46 sueros de bovinos de carne existentes en el laboratorio de la Unidad de Microbiología (Facultad de Veterinaria) que fueron obtenidos a partir de sangre de animales de distintos predios de Uruguay obtenidas entre los años 2014-2019. Las muestras de suero habían sido previamente positivas por ELISA antígeno (IDEXX Bovine Diarrhoea Virus Antigen Test Kit/Serum Plus, IDEXX Laboratories). Se utilizó además una muestra de un animal PI (persistentemente infectado) y 3 vacunas comerciales utilizadas en el país. Al animal PI se le realizó un seguimiento durante 160 días: en los días 0, 30, 60 y 160 fue positivo a ELISA antígeno, negativo a ELISA de anticuerpos y positivo al día 0 y 160 a PCR convencional (De Brun.,2022).

5.2 Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADN complementario

La extracción de ARN se realizó mediante *Quick-RNA™* Viral Kit (Zymo Research, USA) a partir de las muestras de suero. Luego se realizó la retrotranscripción inversa para obtener el ADNc (ADN complementario) utilizando SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline,USA). En ambas etapas se realizó la cuantificación de los ácidos nucleicos (ng/ μ l) mediante Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000UV-vis (NanoDrop Technologies,Inc.,Wilmington,DE) y se visualizó la calidad en geles de agarosa.

5.3 Puesta a punto de la técnica PCR convencional

Se utilizaron protocolos de amplificación descritos previamente para amplificar la región 5'UTR del genoma de VDVB (amplicón de 207 pb) (Maya et al., 2016b; Vilcek et al., 2005). Los *primers* utilizados fueron los mismos tanto para la PCR tiempo final como qPCR y ddPCR utilizando las siguientes secuencias de *primers*: BVDV 190Fmod: 5'-GDA GTC GTC ART GGT TCG AC - 3' (*Forward*), y V326mod 5'- WCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC - 3' (*Reverse*).

Para la PCR convencional se utilizó el equipo C1000 Touch™ Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module BIORAD. La reacción PCR se realizó en un volumen final de 25 µl mezclando 12,5 µl de MangoMix™ Bioline; 1µl *primer Forward* 190 F (10µM); 1 µl de *primer Reverse* V326; 9,5 agua DEPC y 1 µl de ADN molde.

Para establecer la temperatura óptima de “annealing” se utilizó un gradiente de temperatura de 52 - 63°C, utilizando la cepa de referencia NADL (control positivo) en la dilución -5 (0,001 ng/µl) y agua DEPC (control negativo). Se determinó 53°C como la temperatura óptima de *annealing*.

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes: desnaturalización 94°C 5 min seguidas de 40 ciclos a 94°C 30 seg, 53°C 60 seg y una extensión final a 72°C, 30 seg. Los productos obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X, teñido con *Good View Nucleic Acid Stain*, agregándose en la corrida un marcador de peso molecular de 100 pb. La corrida fue realizada durante 40 min a 100 voltios (V). Por último, los geles se visualizaron en un transiluminador de geles con luz ultravioleta.

5.4 Puesta a punto de la técnica “Real time PCR” (qPCR) con SYBR Green

La *Real time* PCR fue realizada siguiendo el protocolo descrito por (Maya et al., 2016b). La misma se realizó en un volumen final de 20 µl por reacción conteniendo: 10 µl de SYBR Green Sensifast SYBR NO ROX- kit (Bioline); 0,4 µl de primer forward 190 F (10uM); 0,4 µl de primer reverse V326 (10uM), 7,2 µl agua DEPC y 2 µl ADN. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C por 10 min y 45 ciclos de 95°C por 15 seg y annealing-extensión 50°C por 1 min. El equipo utilizado fue un Rotor-Gene®6000 (Corbett Research, Qiagen).

5.5 Estandarización de la técnica “*Droplet Digital PCR*” (ddPCR)

Utilizando protocolos y bibliografía de *Droplet Digital PCR* para otros virus (De Brun et al., 2022; Pinheiro-de-oliveira et al., 2018a; Zhang et al., 2019), se estandarizó la técnica ddPCR para el virus de la DVB utilizando el equipo QX200™ *Droplet Digital*™ PCR System disponible en el laboratorio de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Veterinaria.

La ddPCR fue realizada en un volumen total de 22 μ l por reacción conteniendo: 11 μ l de QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix® (BioRad); 0,55 μ l de primer *Forward* 190 F (10 μ M); 0,55 μ l de primer *Reverse* V326 (10 μ M), 8 μ l agua DEPC y 1,1 μ l ADN molde. Cada muestra (mix + ADN) fue emulsionada y colocada en un cartucho que contiene 3 pocillos (Fig. 4) en el cual se formarán las “gotas” utilizando un aceite específico para EVA Green en el equipo QX200 “Generador de Gotas” (Bio-Rad #186-4002). Posteriormente, las “gotas” fueron transferidas a una placa de 96 pocillos (Eppendorf, Hamburg, Germany) y selladas mediante el equipo PX1™ PCR Plate Sealer (Bio-Rad #181-4000) a 180°C por 5 seg.

El siguiente paso fue el termociclado. Para establecer la temperatura óptima de “annealing” se utilizó un gradiente de temperatura de 52,3 – 62,3°C, utilizando la cepa de referencia NADL (control positivo) en la dilución -5 (0,001 ng/ μ l) y agua DEPC (control negativo).

Las condiciones de ciclado para la ddPCR fueron las siguientes: pre-desnaturalización a 95°C por 5 min y 40 ciclos de 95°C por 30 seg y 60°C por 1 min con una tasa de cambio de temperatura de 2°C/seg.; seguidos de 4°C 5 min y 90°C 5 min.

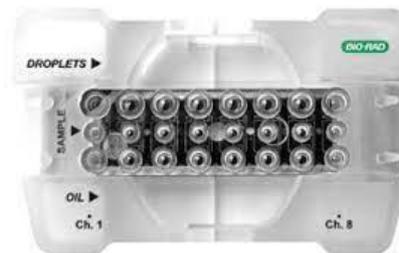


Figura 4. Cartucho para 8 muestras donde se formarán las gotas para cada muestra en el equipo QX200 “Droplet Generator” (Bio-Rad #186-4002). Se utilizan 3 pocillos por reacción: muestra, aceite y gotas.

5.6 Ensayos *in vitro* utilizando leche descremada ultrapasteurizada (UHT)

En una primera etapa se realizó la propagación del virus utilizando la cepa de referencia NADL- DVB en cultivos celulares de la línea MDBK, en los laboratorios de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Veterinaria. Luego, por el método de *Reed y Muench* se realizó la titulación viral (Ramakrishnan, 2016).

A partir de esta muestra de la cepa NADL-DVB, se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta la dilución -5 y posteriormente se contaminó leche artificialmente en un volumen final de 200 µl. En forma paralela y siguiendo la misma metodología, se realizaron los mismos pasos, inoculación, en un volumen final de 200 µl de agua DEPC.

Luego se procedió a realizar la extracción ARN utilizando Quick-RNA™ Viral Kit (Zymo Research, USA) y posteriormente se realizó la retrotranscripción inversa para obtener el ADNc (ADN complementario) utilizando SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline, USA).

En ambas etapas se realizó la cuantificación de los ácidos nucleicos (ng/µl) mediante Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000UV-vis (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE) y se visualizó la calidad en geles de agarosa.

Se realizó PCR convencional y *Droplet Digital* PCR para evaluar el límite de detección de ambas técnicas.

5.7 Detección, secuenciación y análisis filogenético del VDVB en muestras de sueros de bovinos

Con el fin de analizar la variabilidad genética del virus de la DVB y determinar qué genotipos virales circulan en las muestras obtenidas del banco de suero mencionado (descritas en 5.1), se procedió a la amplificación por PCR convencional (descrita en 5.3) y posterior secuenciación automática de los productos obtenidos que se corresponde al gen 5'UTR del genoma de VDVB. Para el objetivo específico N°4, además de las muestras del banco de suero, se agregaron 3 vacunas comerciales y una muestra de un animal PI (persistentemente infectado). Se realizó de igual manera que en las muestras de suero bovino, extracción de ARN mediante *Quick-RNA*™ Viral Kit (Zymo Research, USA) y la retrotranscripción inversa para obtener el ADNc (ADN complementario) utilizando SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline, USA). En ambas etapas se realizó la cuantificación de los ácidos nucleicos (ng/µl) mediante Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000UV-vis (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE) y se visualizó la calidad en geles de agarosa. Se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen – Corea. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa MUSCLE (Edgar, 2004) y una vez obtenido el alineamiento, se utilizó el programa MEGA (Kumar et al., 2018) para identificar el modelo evolutivo óptimo para describir al conjunto de secuencias y posteriormente construir árboles filogenéticos basados en el método de máxima verosimilitud. El análisis involucró 62 secuencias, de las cuales 35 pertenecían a este trabajo de investigación. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA X (Kumar et al., 2018).

5.8 Sensibilidad y especificidad de *Droplet Digital PCR* y *Real time PCR*

Para evaluar la sensibilidad (capacidad de la prueba de detectar verdaderos positivos), especificidad (capacidad de la prueba de detectar verdaderos negativos), valor predictivo positivo (VPP), dado que un resultado fue positivo: probabilidad de que realmente sea infectado y valor predictivo negativo (VPN), dado que un resultado fue negativo: probabilidad de que realmente sea no infectado, con un nivel de confianza del 95%, se calcularon mediante las fórmulas: sensibilidad= $VP/VP+FN$, especificidad= $VN/FP+VN$; VPP= $VP/VP+FP$; VPN= $VN/VN+FN$. Siendo que VP es el número de muestras con resultado verdadero positivo. FN es el número de muestras con resultado falso negativo. VN es el número de muestras con resultado verdadero negativo. FP es el número de muestras con resultado falso positivo. Precisión = $VN+VP/VN+VP+FN+FP$. El índice kappa se calculó para medir la concordancia entre pruebas utilizando el Software WinEpi (working in epidemiology).

A su vez para evaluar la especificidad se utilizaron sueros de otras especies no relacionadas a DVB (suero equino, suero felino) y como control negativo se utilizó agua tratada con dietilpirocarbonato y libre de nucleasas (ADNasa y ARNasa) como NTC (*no template control*) para evitar falsos negativos en todos los ensayos realizados.

Se evaluó el límite de detección (menor número de copias/ μ l detectadas por la prueba diagnóstica) utilizando el plásmido recombinante con el producto de PCR de la región 5'UTR del genoma de VDVB (amplicón de 207 pb), en diluciones seriadas para obtener número de copias/ μ l desde 1×10^1 a 1×10^7 y también utilizando la cepa de referencia NADL-DVB en diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, 1:10000000.

6. RESULTADOS

6.1 Puesta a punto de la técnica PCR convencional

Para la puesta a punto de la técnica se realizó el límite de detección utilizando el plásmido recombinante (pDNA/15 K) conteniendo de 1×10^1 a 1×10^7 número de copias/ μl .

El límite de detección observado fue de hasta 1×10^3 copias / μl (1000 copias) en el carril 4 (Fig. 5).

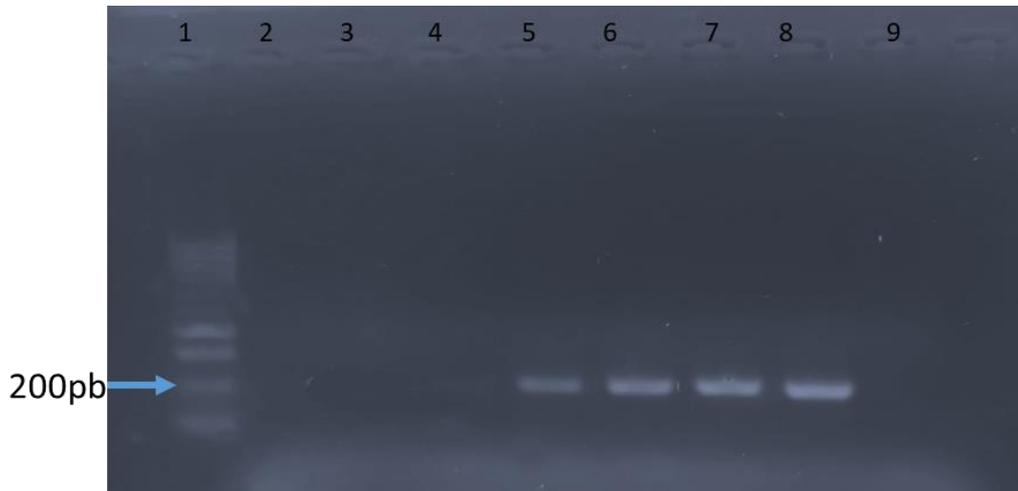


Figura 5. Técnica PCR convencional utilizando diluciones del plásmido recombinante conteniendo el gen 5'UTR del virus de DVB. De izquierda a derecha: carril 1: MPM (100 pb), carril 2: 1×10^1 n° copias/ μl , carril 3: 1×10^2 n° copias/ μl : carril 4: 1×10^3 n° copias/ μl , carril 5: 1×10^4 n° copias/ μl , carril 6: 1×10^5 n° copias/ μl , carril 7: 1×10^6 n° copias/ μl , carril 8: 1×10^7 n° copias/ μl y carril 9: NTC (*no template control*). La banda esperada es de 207 pb.

Paralelamente también se realizó el límite de detección a partir de una cepa de referencia NADL (control positivo) con diluciones seriadas en base 10 (C-1 a C -7) (Fig.6). Con el fin de evaluar la concentración inicial en ng/ μl y la calidad (relación 260/280 y 260/230) de los ácidos nucleicos se midieron todas las diluciones utilizando el equipo Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000UV-vis (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE). Las concentraciones fueron desde 286,3 ng/ μl (C - 1) a $286,3 \times 10^{-7}$ ng/ μl (C -7). El límite de detección observado fue hasta 2,0 ng/ μl (dilución -5).

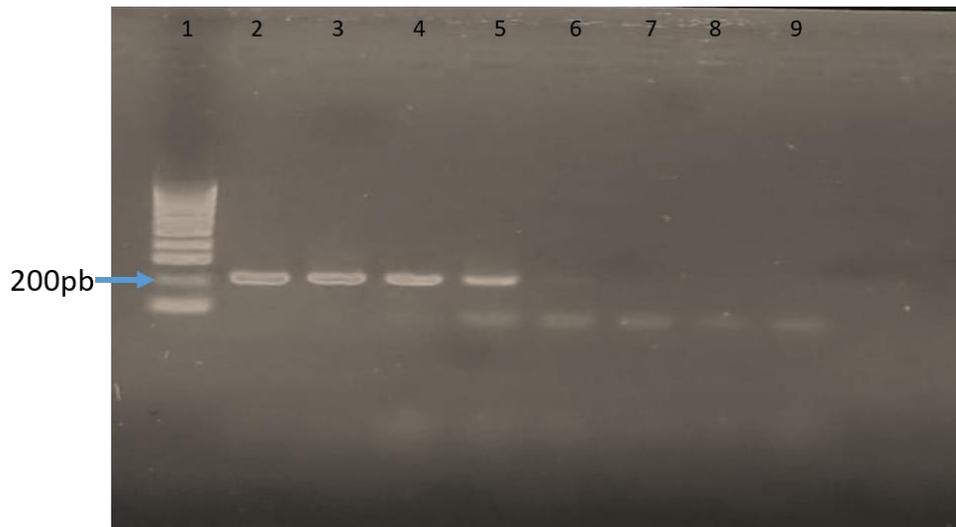


Figura 6. Técnica PCR convencional utilizando diluciones la cepa de referencia NADL-DVB (control positivo) en diluciones seriadas en base 10. De izquierda a derecha: carril 1: MPM, carril 2 a carril 8: desde 286,3 ng/μl (C-1) hasta 286,3 x 10⁻⁷ ng/μl (C-8) y carril 9: NTC (*no template control*).

En una primera etapa se realizó la técnica PCR convencional a todas las muestras con el fin de obtener resultados cualitativos: muestras positivas y negativas. Todas las muestras se estandarizaron a 200 ng/μl como punto de partida para realizar las diferentes técnicas moleculares de diagnóstico.

Una vez estandarizada la PCR convencional, los resultados obtenidos a partir de 46 muestras de suero testeadas por esta técnica fueron: 27 muestras positivas y 19 muestras negativas. A partir de estos resultados, se realizaron en una segunda etapa y en paralelo las técnicas *Real time PCR* (qPCR) y *Droplet Digital PCR* (ddPCR).

Por otra parte, también se analizó una muestra de un animal persistentemente infectado (PI). Se partió de una muestra (PI puro) y se realizaron 5 diluciones en base 10. Se midieron en NanoDrop para determinar las concentraciones en ng/μl que fueron las siguientes: 1200 ng/μl (PI puro), 122 ng/μl (PI -1), 11,5 ng/μl (PI -2), 2,3 ng/μl (PI -3), 0,5 ng/μl (PI -4), 0,12 ng/μl (PI -5). El límite de detección fue hasta la dilución -2 (PI-2), 11,5 ng/μl.

6.1.2 Ensayo *in vitro* utilizando leche descremada ultrapasteurizada (UHT)

Con el fin de realizar el ensayo *in vitro* utilizando leche descremada ultrapasteurizada (UHT) para la puesta a punto de la técnica *Droplet Digital* PCR (ddPCR), previamente se realizó una PCR convencional.

Como se menciona en el punto 5.6, utilizamos la cepa NADL-DVB. El título viral obtenido por el método de *Reed* y *Muench* fue de $10^{5.17}$ DICC 50%/50 μ l. A partir de este título viral, obtuvimos que la cepa de la cual partimos para este ensayo tenía 2958 copias virales/ μ l.

Se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta la dilución 10^{-5} y posteriormente se contaminó leche artificialmente y en forma paralela y siguiendo la misma metodología, en agua DEPC.

En la PCR convencional se logró detectar hasta la dilución 10^{-2} del virus de DVB en leche y hasta la dilución 10^{-3} del virus de DVB en agua DEPC, a partir de las diluciones en base 10 realizadas en forma paralela y con las mismas condiciones metodológicas del virus DVB en leche y en agua DEPC (Fig.7).

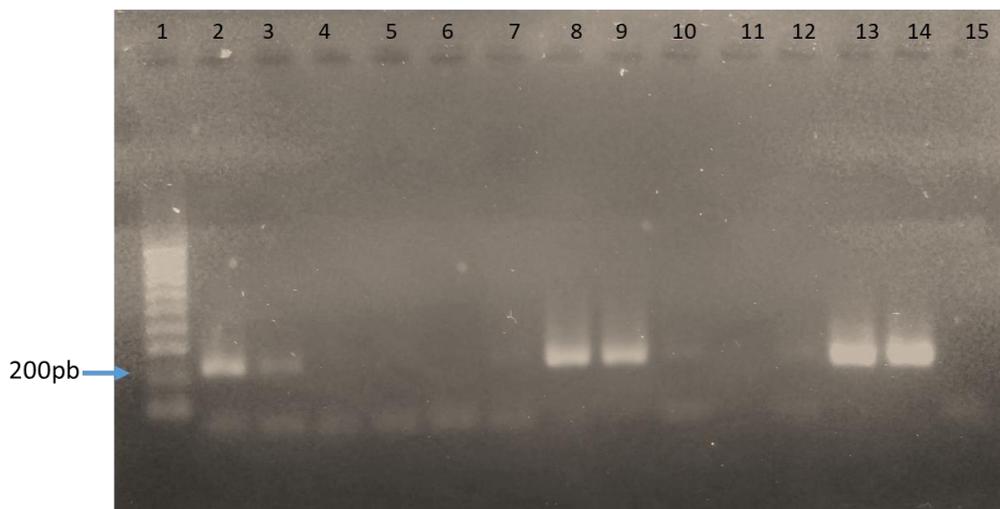


Figura 7. Técnica PCR convencional utilizando la cepa de referencia NADL-DVB en leche y en agua DEPC. De izquierda a derecha: carril 1: MPM (100 pb), carril 2 a 7: 101,7 ng/ μ l a $101,7 \times 10^{-5}$ ng/ μ l, carril 8 a 12: 151,5 a $151,5 \times 10^{-4}$ ng/ μ l y carril 13y 14: virus por duplicado (control positivo) y carril: 15 NTC (*no template control*). Carriles 2 a 7: virus DVB en leche, carriles 8 a 12: virus DVB en agua DEPC. La banda esperada es de 207 pb.

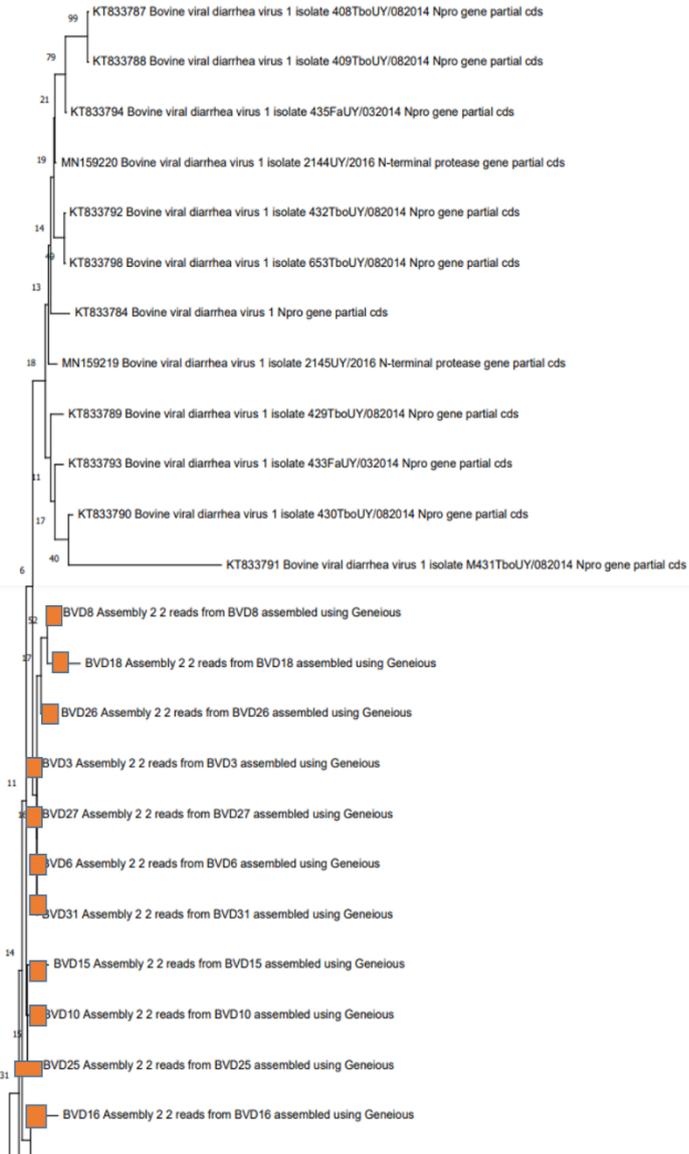
6.2 Análisis de la variabilidad genética de VDVB en Uruguay a partir de las muestras analizadas en el objetivo específico N°4.

El análisis involucró 62 secuencias, de las cuales 35 pertenecían a este trabajo de investigación y las otras 27 secuencias forman parte de la base de datos que se encuentra disponible en GenBank (Fig. 8). De las 32 secuencias analizadas de este trabajo de investigación, 30 (94%) tienen mayor porcentaje de verosimilitud a las secuencias VDVB-1 y 2 (6%) a las secuencias de VDVB-2. A su vez, también se agregaron al análisis filogenético 3 vacunas comerciales y una muestra de animal persistentemente infectado (PI), por duplicado.

Las vacunas comerciales: BVD32, BVD35 y BVD36, se agrupan en VDVB-1.

Las muestras del animal persistentemente infectado (PI): BVD37 y BVD38 también se agruparon en VDVB-1.

Las 2 muestras que se encuentran dentro de VDVB-2, son 2 muestras de suero bovino: BVD2 y BVD13.





VDVB-1

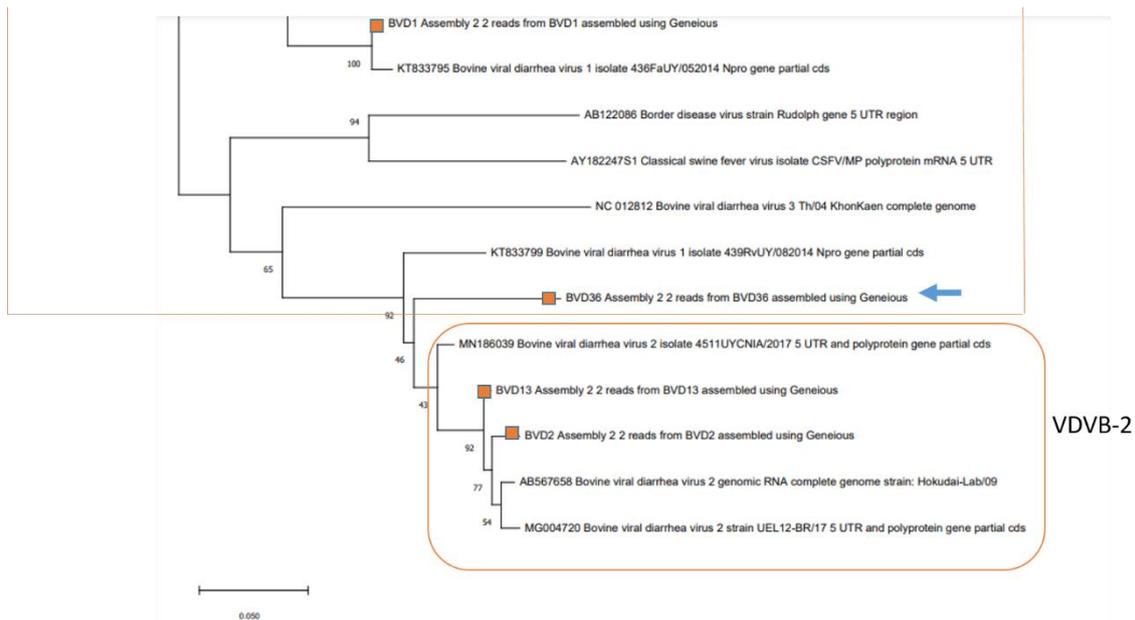


Figura 8. Árbol filogenético de secuencias del gen 5'UTR del genoma del virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB). Las muestras de este estudio se encuentran marcadas con cuadrados y se compararon con secuencias de GenBank. Las flechas azules indican las secuencias pertenecientes a las vacunas comerciales y los círculos rojos al animal persistentemente infectado (PI) por duplicado.

6.3 “Real time PCR” (qPCR)

La curva estándar fue realizada utilizando diluciones seriadas en base 10 de un plásmido recombinante conteniendo la región 5'UTR del genoma de VDVB (pDNA/15 K).

Esta curva estándar fue construida utilizando desde 1×10^7 a 1×10^1 copias/ μ l por triplicado en cada dilución, donde los valores del umbral de ciclo o Cycle Threshold (Ct) fueron lineares (Fig. 9 y 10).

Los valores de Ct obtenidos realizando el promedio del triplicado de cada dilución fueron los siguientes: 1×10^7 n° de copias/ μ l (Ct= 15,36 \pm 0,08); 10^6 n° de copias/ μ l (Ct= 17,85 \pm 0,08); 10^5 n° de copias/ μ l (Ct= 20,97 \pm 0,05); 10^4 n° de copias/ μ l (Ct 25,55 \pm 0,32); 10^3 n° de copias/ μ l (Ct=28,7 \pm 0,23); 10^2 n° de copias/ μ l (Ct=32,72 \pm 0,53); 10^1 n° de copias/ μ l (Ct=34,32 \pm 0,73). Los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo variaron entre 0,05 – 0,31%.

El número de copias virales/ μ l del plásmido obtenidas por qPCR realizando por triplicado cada dilución fue en promedio: 8.044.600 copias/ μ l (1×10^7 copias/ μ l teóricas), 1.404.983 (1×10^6 copias/ μ l teóricas), 157.239 copias/ μ l (1×10^5 copias/ μ l teóricas), 6437 copias/ μ l (1×10^4 copias/ μ l teóricas), 702 copias/ μ l (1×10^3 copias/ μ l teóricas), 59 copias/ μ l (1×10^2 copias/ μ l teóricas), 14,5 copias/ μ l (1×10^1 copias/ μ l teóricas),

El coeficiente de regresión (R^2) fue de 0,99 y la eficiencia de amplificación de 102%.

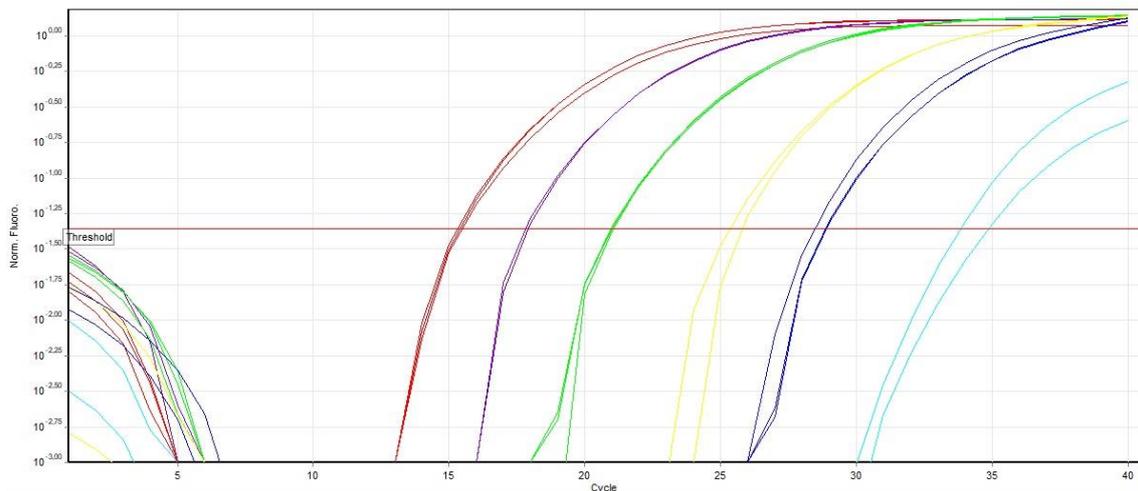


Figura 9. Puesta a punto de la técnica *Real time* PCR utilizando un plásmido recombinante conteniendo el gen 5'UTR del virus de DVB: izquierda a derecha: 1×10^7 copias/ μ l, 1×10^6 copias/ μ l, 1×10^5 copias/ μ l, 1×10^4 copias/ μ l, 1×10^3 copias/ μ l y 1×10^1 copias/ μ l.

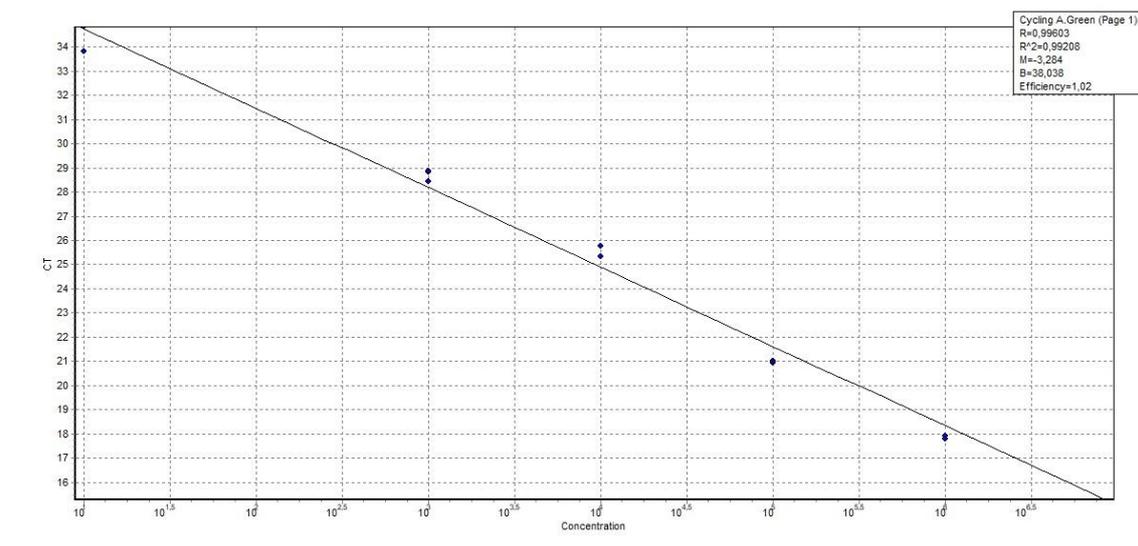


Figura 10. Curva estándar de la técnica *Real time* PCR utilizando un plásmido recombinante conteniendo el gen 5'UTR del virus de DVB. El coeficiente de regresión es 0,99 y la eficiencia de amplificación de 102%.

A su vez, a partir de la cepa de referencia NADL-DVB, se realizó el límite de detección de la técnica *Real time* PCR, en diluciones seriadas base 10 desde la dilución -1 (C-1) hasta la dilución -5 (C-5) por triplicado (mismas diluciones que para la PCR convencional). Las concentraciones fueron desde 286,3 ng/μl (C -1) a 286,3 x 10⁻⁵ ng/μl (C -5) en NanoDrop. En la Figura 11 observamos los resultados obtenidos, siendo los valores de Ct los siguientes: C -1 (Ct= 18,69 ± 0,33); C -2 (Ct= 22,07 ± 0,08); C -3 (Ct= 25,77 ± 0,09); C -4 (Ct= 30,34 ± 0,17); C -5 (Ct= 35,4 ± 0,15). El número de copias/μl calculadas fueron: C-1: 1.406.965 copias/μl; C-2: 134.233 copias/μl; C-3: 4280 copias/μl; C-4: 683 copias/μl y C-5: 48 copias/μl.

Si comparamos estos resultados con el rango dinámico de la curva estándar realizada con el plásmido, el límite de detección por la técnica *Real time* PCR utilizando la cepa de referencia NADL - DVB sería hasta la dilución -4 (C -4) cuya concentración correspondería a 286,3 x 10⁻⁴ ng/μl (Ct= 30,34 ± 0,17) y se calcularon 683 copias/μl.

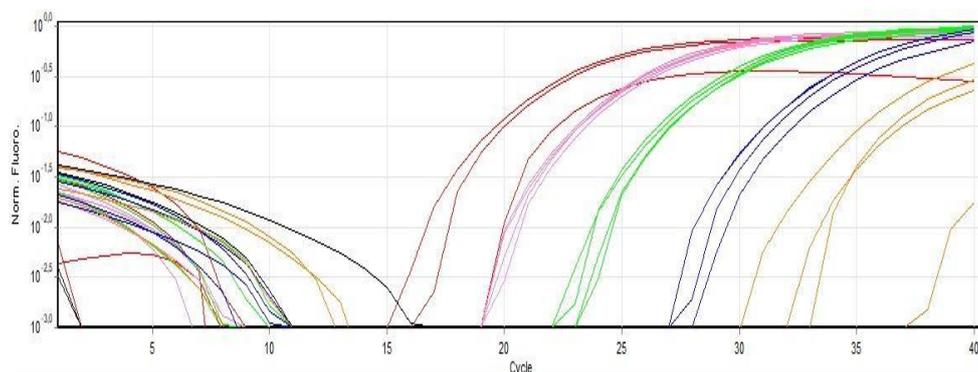


Figura 11. Resultados obtenidos mediante técnica *Real time* PCR utilizando la cepa de referencia NADL-DVB (control positivo) en diluciones seriadas en base 10: izquierda a derecha: (C-1) a (C -5).

Se procesaron un total de 46 muestras por la técnica *Real time* PCR. En la figura 12 observamos los resultados obtenidos de la amplificación para las muestras de suero bovino. Los resultados se analizaron de acuerdo a la curva estándar puesta a punto con el plásmido recombinante conteniendo la región 5'UTR del genoma de VDVB. En base a esto, los resultados cualitativos serían 22 muestras positivas y 24 muestras negativas, según el rango dinámico de la curva estándar: plásmido con 1 x 10⁷ n° de copias/μl (Ct= 15,36 ± 0,08) hasta plásmido con 10¹ n° de copias/μl (Ct=34,32 ± 0,73). El rango dinámico en número de copias/μl sería: 8.044.600 copias/μl - 14,5 copias/ μl. En cada corrida se agregaron 3 puntos de la curva estándar para verificar que los Ct sean los mismos. Los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo variaron entre 0,04 – 1,41%. Si comparamos con los resultados obtenidos por PCR convencional; 6 muestras que eran positivas, dieron un resultado negativo en la técnica *Real time* PCR (muestras 6,9, 10, 15, 29 y 30). A su vez, es importante destacar que una muestra negativa por PCR convencional (muestra 27), fue positiva mediante *Real time* PCR.

En la figura 13 observamos la curva de *melting* para cada una de las muestras analizadas donde la gran mayoría de ellas coinciden o se encuentran en valores aproximados en la temperatura a la cual el 50% de las moléculas de ADN están desnaturalizadas. En promedio el valor aproximado para las muestras es 86,5°C. (Fig.13).

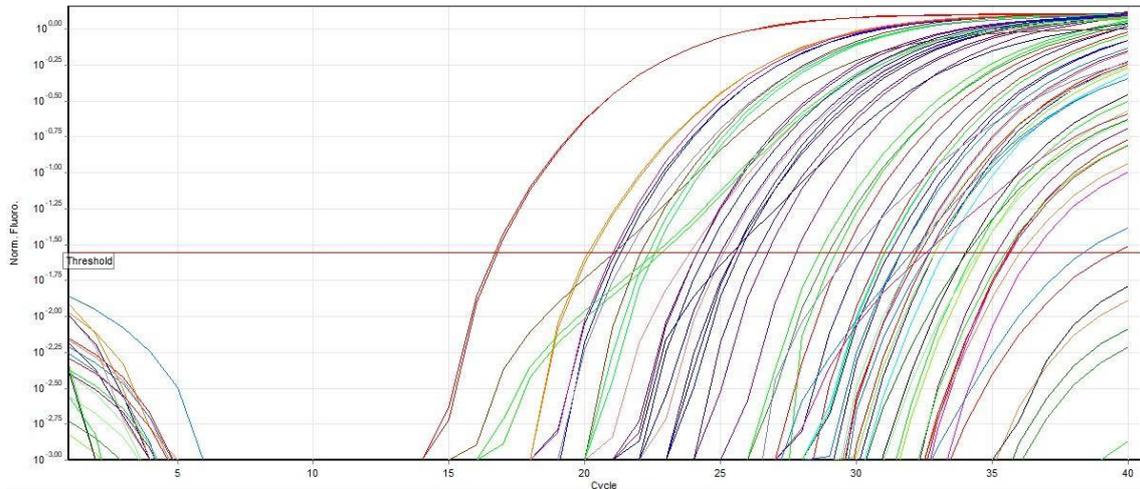


Figura 12. Curva de amplificación de muestras de suero bovino mediante *Real-time PCR*.

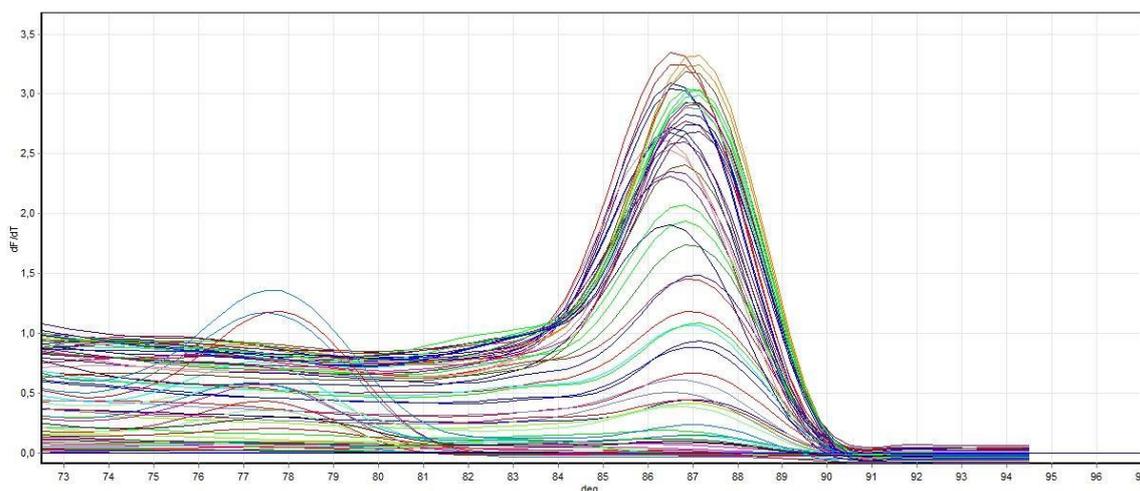


Figura 13. Curva de Melting de las muestras de suero bovino para detección de DVB mediante *Real time PCR*.

Se procesó también una muestra de suero bovino de un ternero persistentemente infectado (PI). A partir de la muestra (PI puro), se realizaron 5 diluciones en base 10. Se midieron en NanoDrop para determinar las concentraciones en ng/ μ l que fueron desde 1200 ng/ μ l (PI puro) hasta 0,12 ng/ μ l (PI -5).

La técnica *Real time PCR* para esta muestra PI logró detectar hasta la dilución -2 (PI -2) cuya concentración corresponde a 11,5 ng/ μ l. Las siguientes diluciones no fueron

detectadas por el equipo. Cada dilución fue realizada por triplicado, para PI-2 el Ct promedio fue de 37,7 y para PI-1 32,2, si comparamos con la curva estándar ambas muestras estarían fuera del rango dinámico.

6.4 “Droplet Digital PCR” (ddPCR)

El límite de detección para la técnica “Droplet Digital PCR” (ddPCR), análogamente a las realizadas para la técnica *Real time* PCR fueron con la cepa de referencia NADL y el plásmido recombinante constituido con el producto de PCR de la región 5'UTR del genoma de VDVB (amplicón de 207 pb).

Los resultados obtenidos mostraron que el límite de detección mediante ddPCR con la cepa de referencia NADL fue hasta 0,24 copias/ μ l ($286,3 \times 10^{-6}$ ng/ μ l) en la dilución -6 y utilizando el Plásmido fue hasta 1×10^2 (100) número de copias/ μ l teóricas.

En la Figura 14 observamos las gotas generadas en la puesta a punto de la técnica ddPCR utilizando la cepa de referencia NADL-DVB.

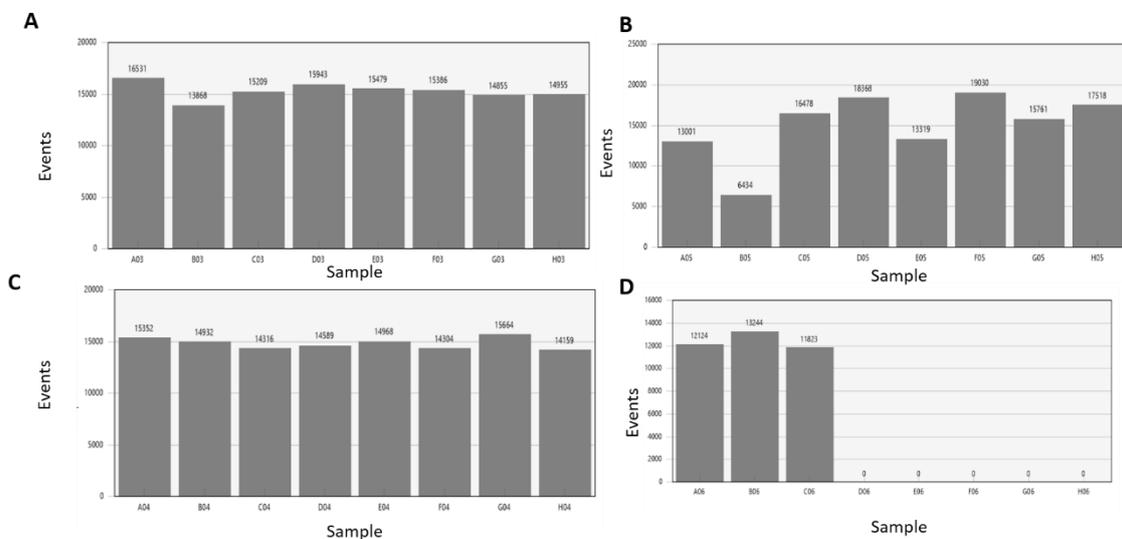


Figura 14. Gotas generadas para la detección de VDVB mediante la técnica *Droplet Digital* PCR (ddPCR) utilizando la cepa de referencia NADL-DVB.

La cepa de referencia NADL fue realizada por triplicado, desde la dilución -1 (C -1) hasta la dilución -7 (C -7) para evaluar el límite de detección de la técnica. En la figura 15 vemos los resultados obtenidos a la salida del equipo mediante el Software QuantaSoft™ Analysis Pro.

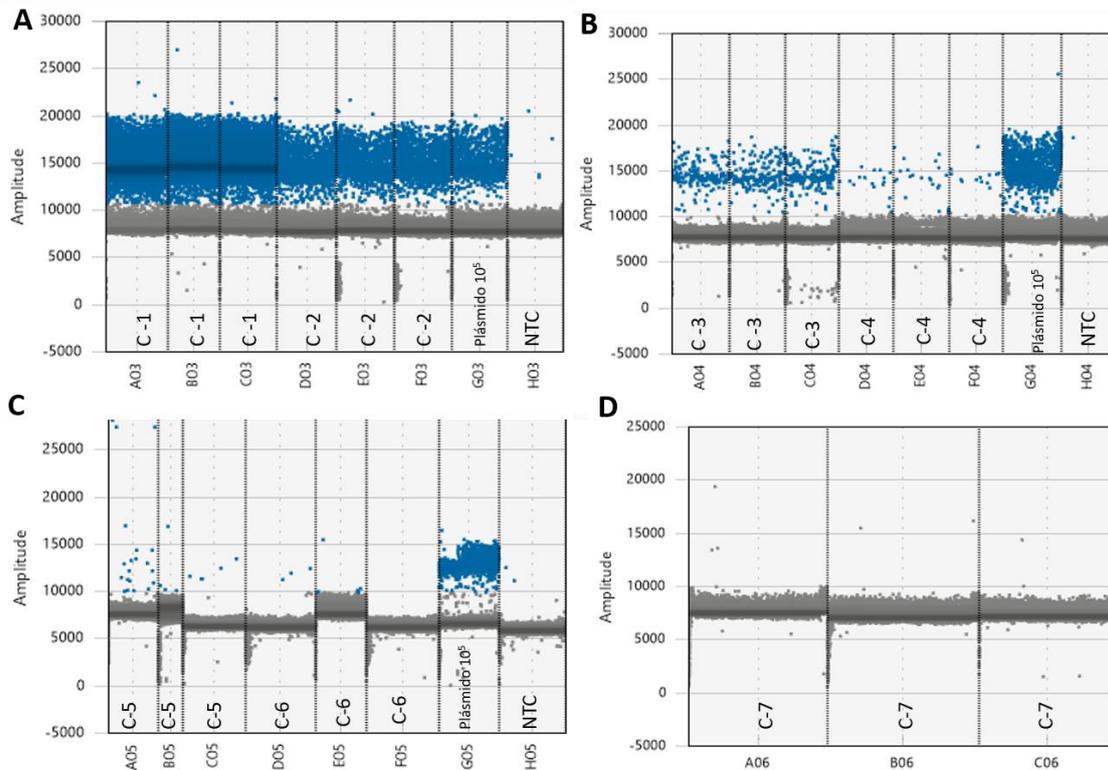


Figura 15. Resultados obtenidos para la detección de VDV-B mediante *Droplet Digital* PCR (ddPCR) utilizando la cepa de referencia NADL-DVB (control positivo) en diluciones seriadas en base 10 desde 286,3 ng/μl (C-1) hasta 286,3 x 10⁻⁷ ng/μl (C-7). Controles de corrida: plásmido con 1 x 10⁵ copias/μl (control positivo) y NTC (*no template control*) como control negativo.

Observamos la cantidad de gotas positivas (azules) como va disminuyendo a medida que se encuentra más diluido y en la dilución -7 (C-7) ya no observamos gotas y la fluorescencia se mantiene en el mismo nivel que los controles negativos (NTC).

La repetibilidad fue evaluada mediante el cálculo de los coeficientes de variación (CV), los mismos variaron entre 0,12% – 0,49%.

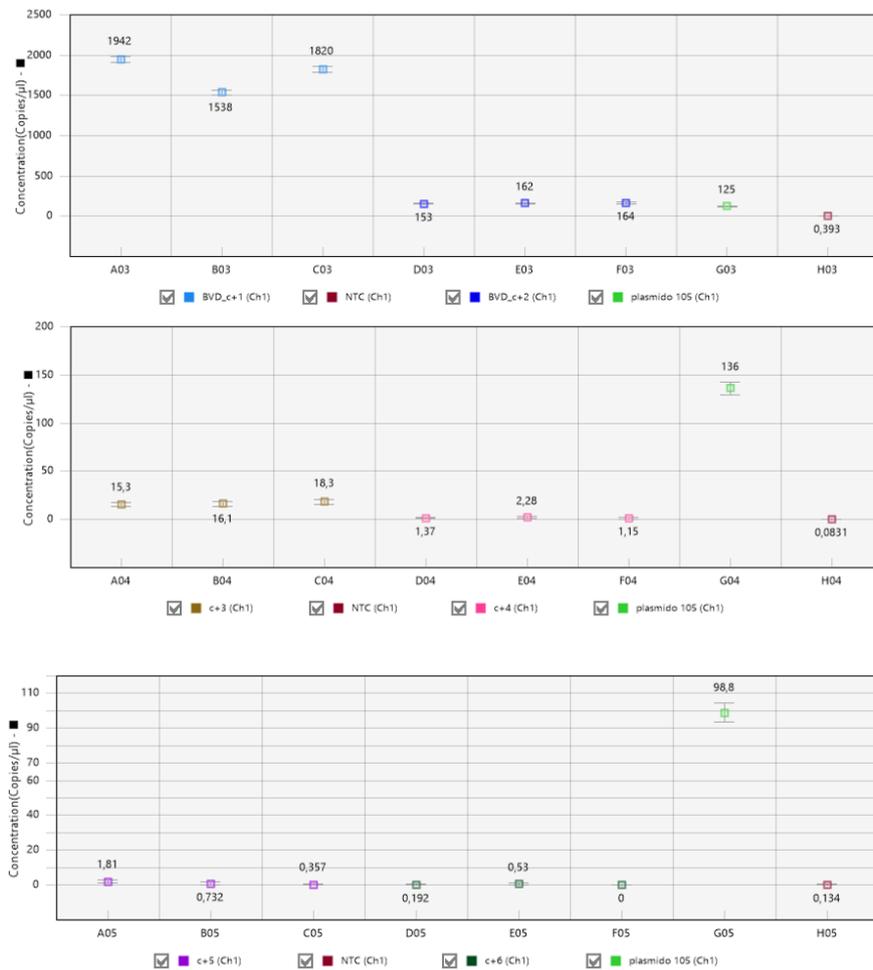


Figura 16. Número de copias/μl de la cepa de referencia NADL-DVB (control positivo) en diluciones seriadas en base 10 mediante *Droplet Digital* PCR (ddPCR). Cada dilución fue realizada por triplicado y agregándose un plásmido con 1×10^5 copias/μl como control positivo y NTC (*no template control*) como control negativo.

Las concentraciones obtenidas de la cepa de referencia NADL-DVB mediante esta técnica fueron: 1766,6 copias/μl (C -1), 146,5 copias/μl (C -2), 16,6 copias/μl (C -3), 1,6 copias/μl (C-4), 0,95 copias/μl (C -5) y 0,24 copias/μl en la última dilución detectada (C -6). Estos valores son el promedio de cada triplicado de cada dilución. Observamos que en la dilución siguiente (C -7) no hubo detección (No call), siendo el resultado igual a los NTC (*no template control*). El promedio del plásmido con 1×10^5 copias/μl (teóricas) fue de 119,7 número de copias/μl (Fig. 16).

Continuando con la puesta a punto de la técnica *Droplet Digital* PCR, también se realizó el límite de detección utilizando el plásmido recombinante que utilizamos para la técnica *Real time* PCR con las concentraciones desde 1×10^7 hasta 1×10^1 copias/ μ l.

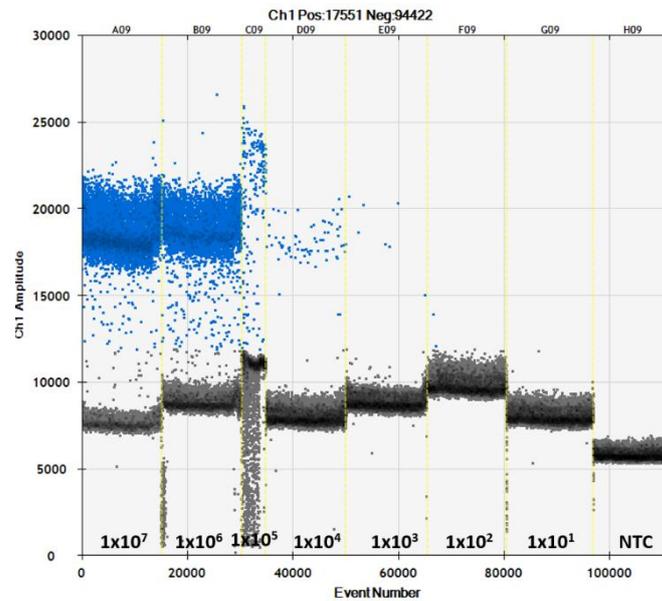


Figura 17. Límite de detección de la técnica *Droplet Digital* PCR utilizando diluciones del plásmido recombinante conteniendo el gen 5'UTR del virus de DVB; desde 1×10^7 hasta 1×10^1 copias/ μ l (A9 – G09) y NTC (*no template control*) (H09). Gotas negras= eventos negativos y gotas azules= eventos positivos.

Observamos que el límite de detección con el plásmido fue hasta 1×10^2 (100) número de copias/ μ l, luego no se observan gotas positivas (azules) (Fig. 17).

Las concentraciones obtenidas utilizando el plásmido recombinante conteniendo el gen 5'UTR del virus de DVB mediante esta técnica fueron: 1541 copias/ μ l (1×10^7), 610 copias/ μ l (1×10^6), 49 copias/ μ l (1×10^5), 5,5 copias/ μ l (1×10^4), 0,53 copias/ μ l (1×10^3), 0,16 copias/ μ l (1×10^2) y 0 copias/ μ l (1×10^1).

Luego de la puesta a punto de la técnica ddPCR tanto con la cepa de referencia NADL – DVB y el plásmido recombinante, se procedió a realizar el límite de detección para muestras de campo, en este caso a partir de un animal PI (persistentemente infectado) que en primera instancia fue realizada una PCR convencional para su diagnóstico, como se explica en el punto 5.1.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

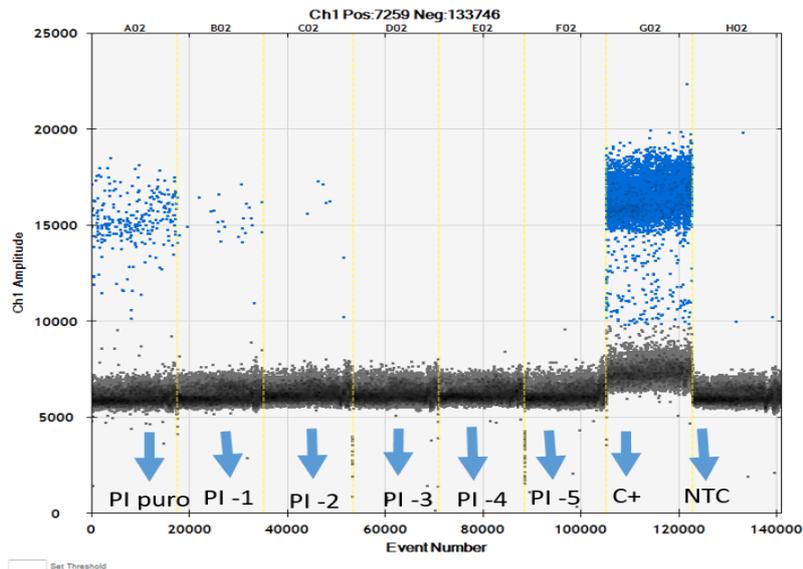


Figura 18. Resultados obtenidos por *Droplet Digital* PCR para una muestra de campo (animal persistentemente infectado). Carril A02: PI puro (1200 ng/μl), carril B02: PI -1 (122ng/μl), carril C02: PI -2 (11,5 ng/μl), carril D02: PI -3 (2,3 ng/μl), carril E02: PI -4 (0,12 ng/μl), carril F02: PI -5 (0,12 ng/μl), carril G02: control positivo cepa referencia NADL (2800 ng/μl) y carril H02: NTC (*no template control*).

La técnica ddPCR para la muestra PI logró detectar hasta 0,45 copias/μl (PI -2) cuya concentración corresponde a 11,5 ng/μl. A partir de la dilución -3 (PI -3) no se observan gotas positivas. Se cuantificaron para PI puro: 17,4 copias/μl, PI -1: 1,6 copias/μl, PI -2: 0,45 copias/μl y las diluciones -3 a -5: 0 copias/μl (Fig. 18).

6.4.1 “Droplet Digital PCR” (ddPCR): Ensayo *in vitro* utilizando leche descremada ultrapasteurizada (UHT)

Los resultados obtenidos en primer lugar nos permiten destacar que se logró de forma exitosa la extracción de ARN utilizando Quick-RNA™ Viral Kit (Zymo Research, USA) a partir de una muestra compleja como la leche por su composición y distribución de sus componentes.

El título viral obtenido en cultivos celulares y calculados por el método de *Reed y Muench* fue de $10^{5.17}$ DICC 50%/50 μ l. A partir de este título viral, obtuvimos que la cepa de la cual partimos para este ensayo tenía 2958 unidades infectantes/ μ l.

Mediante la técnica *Droplet Digital PCR* podemos ver que se logra detectar el virus en leche hasta la dilución -5 ($101,7 \times 10^{-5}$ ng/ μ l) (Fig.19).

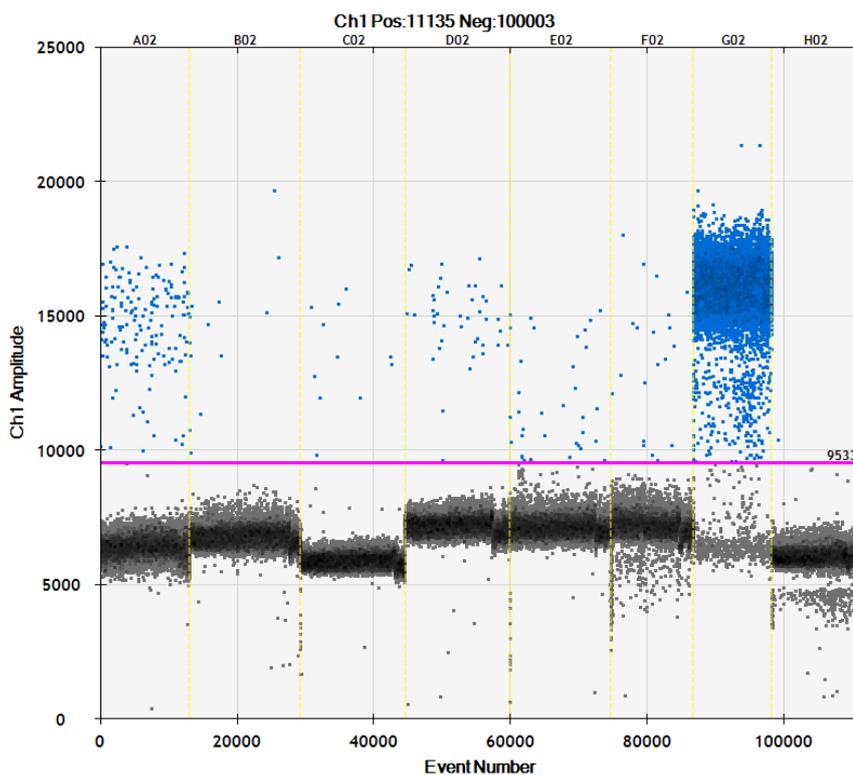


Figura 19. Resultados obtenidos por *Droplet Digital PCR* a partir de virus DVB cepa de referencia NADL-DVB en leche. Las concentraciones van desde $101,7$ ng/ μ l a $101,7 \times 10^{-5}$ (carril A02 a F02), virus 1500 ng/ μ l (G02) y NTC (*no template control*) (H02).

El número de copias virales obtenidas para el virus DVB en leche contaminada artificialmente en concentraciones desde $101,7$ ng/ μ l a $101,7$ ng/ μ l $\times 10^{-5}$ (A05- F05) fueron: $14,6$ copias/ μ l (A02); $0,8$ copias/ μ l (B02); $0,77$ copias/ μ l (C02); $3,3$ copias/ μ l (D02); $1,8$ copias/ μ l (E02) y $1,5$ copias/ μ l (F02).

Para el virus DVB puro (control positivo, 1500 ng/ μ l) se cuantificaron 3400 copias/ μ l (G02) y 0 copias/ μ l NTC (*no template control*) (H02). Podemos ver que se logran detectar copias virales, pero se necesitarían más ensayos para poder realizar la puesta a punto de

esta técnica en muestras de leche con virus DVB, ya que a su vez las diluciones obtenidas no fueron correlativas.

Por otro lado, el mismo ensayo realizado detectando el virus DVB en agua DEPC mediante la técnica *Droplet Digital PCR* también logra detectar hasta la dilución -4 ($151,5 \times 10^{-4}$ ng/ μ l) (Fig.20).

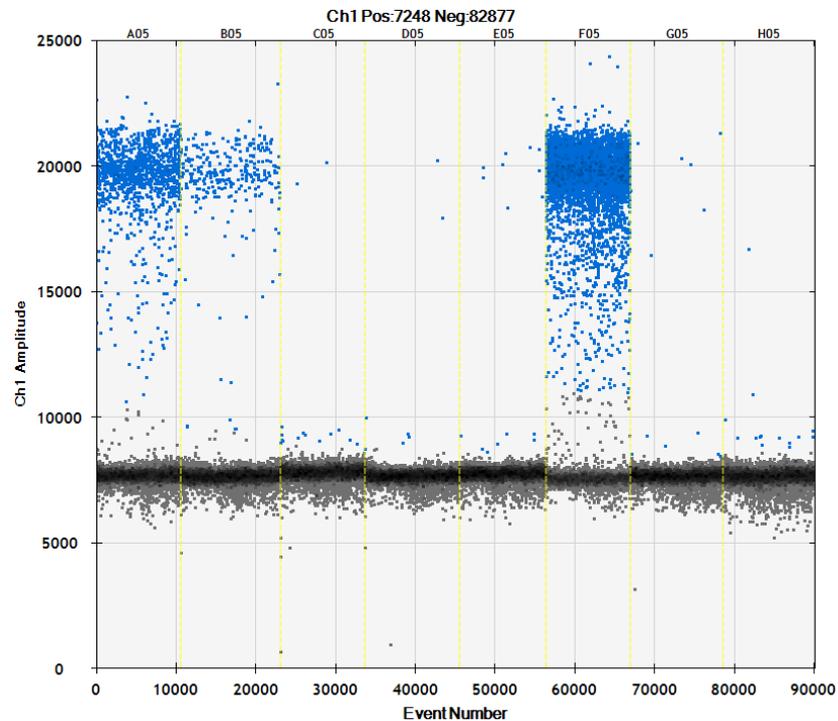


Figura 20. Resultados obtenidos por *Droplet Digital PCR* a partir de virus DVB cepa de referencia NADL-DVB en agua DEPC. Las concentraciones van desde $151,5$ ng/ μ l a $151,5 \times 10^{-4}$ (carril A05 a E05), virus 1500 ng/ μ l (F05), muestra de campo $1,5$ ng/ μ l y NTC (*no template control*).

El número de copias virales obtenidas para el virus DVB en agua DEPC en concentraciones desde $151,5$ ng/ μ l a $151,5$ ng/ μ l $\times 10^{-4}$ (A05- E05) fueron: 145 copias/ μ l (-1); $28,2$ copias/ μ l (-2); $1,7$ copias/ μ l (-3); $0,7$ copias/ μ l (-4); $0,5$ copias/ μ l (-5). Para el virus DVB puro (control positivo, 1500 ng/ μ l) se cuantificaron 888 copias/ μ l (F05). Luego una muestra de campo $1,2$ copias/ μ l (G05) y NTC (*no template control*) (H05).

6.5 Análisis y resultados obtenidos comparando las tres técnicas moleculares de diagnóstico para DVB

Para realizar un análisis y poder comparar ambas técnicas cuantitativas moleculares para el diagnóstico de DVB, realizamos una gráfica de regresión lineal mediante el \log_{10} de los resultados obtenidos en número de copias/ μ l para lograr normalizar los datos numéricos (Fig.21). Los datos analizados en este caso, fueron los comparables entre ambas técnicas, siendo los que se encuentran dentro del rango dinámico de la curva estándar para la *Real time* PCR. La pendiente es igual a 1,47.

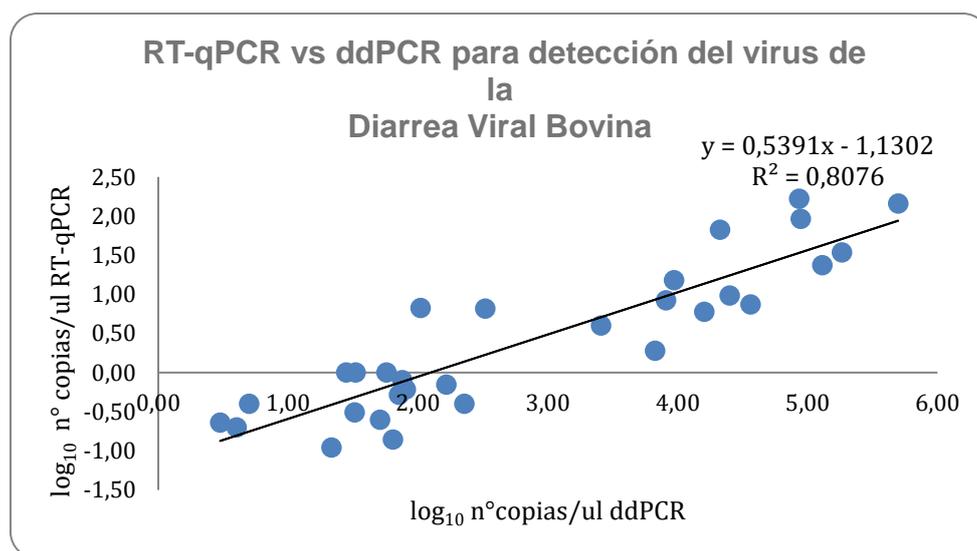


Figura 21. Gráfica de regresión lineal de los resultados de cuantificación de VDV B mediante *Real time* PCR y *Droplet Digital* PCR. Los valores están expresados como \log_{10} n° copias/ μ l. Ecuación de regresión lineal: $y = 0,5391x - 1,1302$ y $R^2 = 0,81$

A continuación, observamos en la Tabla 2, los límites de detección de las técnicas moleculares utilizando muestras controles: plásmido recombinante conteniendo el gen 5'UTR del virus de DVB y cepa de referencia NADL-DVB. También se muestran resultados del ensayo *in vitro* utilizando leche descremada ultrapasteurizada (UHT), donde se contaminó leche artificialmente, y en forma paralela y con las mismas condiciones metodológicas del virus DVB en leche y en agua DEPC.

Tabla 2. Límites de detección de PCR convencional, *Real time* PCR y *Droplet Digital* PCR en muestras control de DVB y en ensayo contaminando leche artificialmente con DVB

Muestras control	PCR convencional	<i>Real time</i> PCR Ct	<i>Real time</i> PCR copias/ μ l	<i>Droplet Digital</i> PCR
Plásmido	dilución: 1×10^3	$15,48 \pm 0,24$ a $34,32 \pm 0,73$	8.044.600 a 14,5	dilución: 1×10^2
Cepa NADL-DVB	2,0 ng/ μ l	$30,34 \pm 0,17$	dilución: C-4 = $286,3 \times 10^{-4}$ ng/ μ l	dilución: C-6 = $286,3 \times 10^{-6}$ ng/ μ l
DVB en leche *	dilución -2: $101,7 \times 10^{-1}$ ng/ μ l	NC	NC	dilución -5: $101,7 \times 10^{-5}$ ng/ μ l
DVB en agua DEPC	dilución -3: $151,5 \times 10^{-2}$ ng/ μ l	NC	NC	dilución -4: $151,5 \times 10^{-4}$ ng/ μ l

NC: no corresponde

* se contaminó leche artificialmente con concentración conocida de cepa NADL-DVB

En la técnica *Droplet Digital* PCR el valor máximo obtenido en las muestras de suero analizadas fue de 167 copias/ μ l y el valor mínimo de 0 copias/ μ l; mientras que en la técnica *Real time* PCR el valor máximo obtenido fue de 497026,5 n° de copias/ μ l y el valor mínimo de 3 copias/ μ l (Anexo 1).

Se observa una coherencia entre las tres técnicas, las muestras negativas por PCR convencional en su mayoría también son negativas por qPCR y ddPCR salvo algunas excepciones (muestras 20 y 24) que fueron detectadas copias virales mediante ddPCR. De las 46 muestras analizadas por PCR convencional 27 son positivas y 19 son negativas. En la técnica qPCR, de las 27 muestras positivas por técnica PCR convencional, 22 fueron positivas por *Real time* PCR.

A su vez, de las 27 muestras positivas por PCR convencional todas fueron positivas por ddPCR más 3 muestras: 20, 24 y 27 que fueron positivas por ddPCR. Serían entonces un total de 30 muestras positivas por ddPCR (Anexo1).

Otra relación que se observa, es que los resultados de la qPCR y ddPCR son directamente proporcionales: a mayor número copias virales por qPCR, mayor también el número de copias virales mediante ddPCR. Esto se puede observar en el Anexo 1.

Tabla 3. Resultados cualitativos (positivos y negativos) obtenidos del Virus de la Diarrea Viral Bovina mediante tres técnicas moleculares de diagnóstico: PCR convencional, *Real time* PCR y *Droplet Digital* PCR de muestras de suero bovino

Muestras suero DVB (resultado cualitativo)	Positivos	Negativos
PCR convencional	27	19
<i>Real time</i> PCR	22	24
<i>Droplet Digital</i> PCR	30	16

6.6 Análisis estadístico

Las pruebas diagnósticas *Droplet Digital* PCR y *Real time* PCR presentan un grado de concordancia excelente: Coeficiente Kappa= 0,802 con un Nivel de confianza del 95%. La proporción de conformidad observada: 90% y la proporción de conformidad esperada 49,6%.

Se analizaron la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, precisión, los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de resultados de *Droplet Digital* PCR y *Real time* PCR. Se muestran los datos de: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) con un nivel de confianza del 95%

Test	VP	FN	FP	VN	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Precisión (%)	Índice Kappa (K)
ddPCR	27	0	3	16	100	84.2	90	100	93.5	0.80
qPCR	22	5	1	18	81.5	94.7	95.7	78.3	86.	

Sensibilidad= $VP/VP+FN$. Especificidad= $VN/FP+VN$. VPP= $VP/VP+FP$. VPN= $VN/VN+FN$. VP es el número de muestras con resultado verdadero positivo. FN es el número de muestras con resultado falso negativo. VN es el número de muestras con resultado verdadero negativo. FP es el número de muestras con resultado falso positivo. Precisión = $VN+VP/VN+VP+FN+FP$. El índice kappa se calculó para medir la concordancia entre pruebas.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo, por primera vez se analizan y se comparan resultados de técnicas moleculares de diagnóstico para la detección y cuantificación del virus de la DVB: PCR convencional, *Real time* PCR y *Droplet Digital* PCR, siendo estas últimas cuantitativas (n° copias virales/ μ l). Existen numerosas investigaciones que comparan estas dos últimas técnicas para la detección y cuantificación en diferentes muestras: virus de Leucosis Bovina (De Brun et al., 2022), virus de fiebre aftosa FMVD A24 Cruzeiro (Pinheiro-de-oliveira et al., 2018b); HIV-1 (Henrich et al., 2012); BK virus (Bateman et al., 2017); enterovirus 71 (Lui & Tan, 2014); virus del dengue (Abachin et al., 2018); virus encefalitis japonesa (Wu et al., 2017). Todos ellos logran demostrar que la *Droplet Digital* PCR es una herramienta de diagnóstico molecular que ofrece amplias ventajas en comparación a la *Real time* PCR: mayor especificidad, sensibilidad y reproducibilidad que *Real time* PCR (Abachin et al., 2018; Alikian et al., 2017; Alteri et al., 2020; Hayden et al., 2013; Zhang et al., 2019). A partir del año 2014, comienzan a surgir numerosas publicaciones donde se utiliza la técnica *Droplet Digital* PCR y la misma ha demostrado calificar para estas características y superar ampliamente algunas debilidades de otras técnicas como la *Real time* PCR. Por estas razones es que, uno de los objetivos de la tesis fue estandarizar esta herramienta para el virus de la Diarrea viral bovina. El número de muestras utilizadas en el presente trabajo fue similar al utilizado en otras investigaciones para comparar estas técnicas: 34 muestras (De Brun et al., 2022), 25 muestras (Abachin et al., 2018), 11 muestras (Pinheiro-de-oliveira et al., 2018a), 55 muestras (Alteri et al., 2020), 50 muestras (Hayden et al., 2013).

En términos generales, la ddPCR tuvo una performance muy satisfactoria para el virus de la DVB. Utilizando la cepa de referencia NADL-DVB, la ddPCR logró detectar utilizando la misma muestra cepa NADL-DVB, 2 veces más diluida la muestra de origen, siendo hasta la dilución C-6 en ddPCR y hasta la dilución C-4 en qPCR. un orden más en número de copias virales que la técnica *Real time* PCR. De las diluciones realizadas, hasta la dilución -7 con la cepa de referencia NADL-DVB: ddPCR detectó 6/7, qPCR 4/5 y la PCR convencional (5/7) positivas. Más específicamente, el límite de detección por ddPCR fue 0,24 copias/ μ l, que corresponde a $286,3 \times 10^{-6}$ ng/ μ l 1 (dilución -6) mientras que en la técnica qPCR fue 683 copias/ μ l, que corresponde a $286,3 \times 10^{-4}$ ng/ μ l (Ct= $30,34 \pm 0,17$), dilución -4 (C -4). Podemos comparar estos resultados con los obtenidos en un trabajo de detección de Circovirus porcino III donde el límite de detección fue de 0,06 copias/ μ l en ddPCR en y 16,04 copias/reacción en qPCR (Zhang et al., 2019). Aquí destacamos que en ddPCR fue comparable el resultado, pero en qPCR nuestro resultado fue mayor. Cabe destacar que la reproducibilidad de la qPCR es menor que ddPCR, es decir que realizar el mismo ensayo en otro laboratorio, generalmente lleva a obtener similares resultados en ddPCR pero no tanto así en qPCR (Jaworski et al., 2018). Esto principalmente está fundamentado en que la ddPCR no necesita de la calibración de una curva estándar (Abachin et al., 2018; Alikian et al., 2017; Yang et al., 2014); se debe evaluar para ensayos en ddPCR la repetibilidad, en este caso como mencionamos en punto

6.4 los coeficientes de variación oscilaron entre 0,12-0,49%, similar a lo obtenido en SARS-CoV-2 con ddPCR (Alteri et al., 2020).

En otros trabajos con ddPCR, el límite de detección para otro virus, en este caso virus de fiebre aftosa, fue de: $10^{1.4}$ TCID₅₀/ml y 26,5 copias/ μ l (Pinheiro-de-oliveira et al., 2018a), siendo también resultados similares. Por otra parte, varios estudios de investigación relacionados al Cáncer utilizan esta herramienta de diagnóstico molecular por su alta sensibilidad y especificidad. En un estudio que busca mutaciones ptDNA en etapas tempranas se encontró una sensibilidad del 93,3 % especificidad del 100% y 96,7% de precisión (Beaver et al., 2015), estos resultados son muy similares al obtenidos en este trabajo (ver Tabla 4). Lo mismo ocurre cuando se buscan bajas frecuencias por ejemplo de CNV's donde ddPCR tiene una sensibilidad de 2 copias/ μ l (cuantificación absoluta) mientras que en la qPCR son cuantificaciones relativas(Δ Ct) (Olsson et al., 2016).

La técnica *Real time* PCR necesita de la realización de una curva estándar para lograr esta cuantificación relativa, en este caso utilizamos el plásmido conteniendo la región 5'UTR del genoma de DVB. Los valores obtenidos de la curva estándar fueron: coeficiente de regresión (R^2) de 0,99 y eficiencia de amplificación de 102%. Estos valores se encuentran dentro del rango de valores admitidos: eficiencia de amplificación de 90 – 110% y coeficiente de regresión $> 0 = a$ 0,99 (Nolan et al., 2006; Pinheiro-de-oliveira et al., 2018b; Wu et al., 2017; Zhang et al., 2019).

Los resultados cualitativos de las muestras de suero bovino analizadas fueron: de las 46 muestras analizadas por PCR convencional: 27 positivas y 19 negativas, por la técnica ddPCR: 30 positivas y 16 negativas y por la técnica qPCR, 22 muestras positivas y 24 muestras negativas. Esto llama mucho la atención, ya que muestras positivas por PCR convencional no se encontraron dentro del rango dinámico de la curva estándar y por esta razón son consideradas como negativas o <10 copias/ μ l. En este caso 6 muestras (muestras 6, 9, 10, 15, 29 y 30) tienen un resultado positivo por PCR convencional y ddPCR, pero tienen un resultado negativo o <10 copias/ μ l por qPCR. Esto se ve reflejado al comparar el resultado en % de la sensibilidad de ambas técnicas: siendo en qPCR 81,5% y en ddPCR 100%. Entonces, desde un punto de vista cualitativo y de la capacidad de la técnica de detectar muestras positivas, podemos considerar que ddPCR está detectando un número de muestras positivas mayor que las otras dos técnicas moleculares.

Esto es un punto muy importante, ya que a veces al realizar la curva estándar se debe contemplar que la eficiencia de amplificación y el coeficiente de regresión se encuentren dentro de los valores admitidos y que los valores de Ct obtenidos se correlacionen a la concentración de ADN molde. En algunos casos, puede ocurrir que si agregamos más puntos a la curva estándar la técnica se podría volver imprecisa y no podemos colocarlos dejando tal vez muestras fuera de rango y que siendo positivas son evaluadas como negativas.

En cuanto a la cuantificación de las muestras de suero bovino, el número de copias virales osciló en el orden de 10^4 - 10^5 copias/ μ l mediante qPCR y entre 10^1 - 10^2 mediante ddPCR. Estos resultados son comparables a los obtenidos en similares trabajos de investigación con otro virus de la misma Flia. *Flaviviridae* (Zika virus), donde también se compararon las técnicas qPCR y ddPCR. El rango de detección para qPCR fue de 10 copias/ μ l – 1 x

10^8 copias/ μ l mientras que el rango de detección para ddPCR fue de 1 copia/ μ l – 1×10^4 copias/ μ l (Hui et al., 2018).

A su vez, los valores para la cuantificación en sueros bovinos obtenidos mediante qPCR fueron mayores a los obtenidos por otros autores (Kosinova et al., 2007) donde fueron de 10^2 cDNA /VDVB copias/ μ l. Esto nos demuestra que, al ser una técnica de cuantificación relativa, en este caso, a una curva estándar realizada con un plásmido conteniendo el gen de interés para el diagnóstico de DVB, se encontraron fuera del rango dinámico posiblemente por bajas cargas virales.

La ddPCR logró detectar bajas concentraciones de copias del virus; siendo importante además que la cuantificación y detección de ácidos nucleicos está basado en el principio de distribución de *Poisson*, en lugar de tener que realizar una curva estándar para lograr la cuantificación. Es de destacar que 2 muestras (muestras 20 y 24) por PCR convencional y *Real time* PCR mostraron un resultado negativo, pero sin embargo en la técnica ddPCR se observaron gotas positivas: muestra 20 (Ct 35,9; ddPCR 0,25 copias/ μ l) y muestra 24 (Ct 35,45; ddPCR 0,4 copias/ μ l). Esto fue similar a lo observado por Hui et al., (2018) para el Zika virus, donde una muestra de suero bovino (“B”) el resultado obtenido por qPCR fue negativo (Ct 38,87) y por ddPCR se calcularon de 13,8 – 14,3 copias/ μ l. Resultados similares obtuvo De Brun et al., 2022, donde 5 animales analizados para el diagnóstico del virus de la Leucosis bovina fueron negativos por Inmunodifusión en gel de agar (IDGA), ELISA y PCR convencional pero positivos por ddPCR; a su vez esta técnica logró detectar animales positivos precozmente desde el día 2.

La detección temprana del animal PI es uno de los puntos clave en los programas de control/erradicación de DVB (Zoccola et al., 2017). Contar con herramientas de diagnóstico molecular robustas, de alta sensibilidad y especificidad, con bajos límites de detección, son fundamentales para lograr este fin. En este trabajo observamos que en muestras de suero de animales PI que presenten muy bajas cargas virales, la ddPCR logra detectar concentraciones más bajas que la qPCR. La técnica ddPCR para esta muestra PI logró detectar hasta 0,45 copias/ μ l (PI -2) cuya concentración corresponde a 11,5 ng/ μ l. La cuantificación de la muestra sin diluir (PI puro) por ddPCR fue de 17,4 copias/ μ l. En la técnica qPCR, observamos que para PI-2 el Ct promedio fue de 37,7 y para PI-1 32,2. En este caso, si comparamos con la curva estándar ambas muestras estarían fuera del rango dinámico. Las siguientes diluciones no fueron detectadas por el equipo en esta técnica. Esto también se demuestra en otras investigaciones donde se analizan 10 muestras de terneros PI para el diagnóstico y cuantificación de VDVB, y el límite de detección por la técnica *Real time* PCR fue de 100 copias de ARN viral por reacción en la dilución 10^{-5} de una muestra de animal PI (TCID 50) (Zoccola et al., 2017). Es decir que cuando partimos de muestras con muy bajas cargas virales la técnica qPCR no logra detectarlas, sin embargo, observamos que la ddPCR tiene mayor sensibilidad y límite de detección y por lo tanto logra cuantificar copias virales muy bajas. De todas maneras, tenemos que mencionar que nos llama muchísimo la atención cargas virales tan bajas cuando estamos analizando una muestra de un animal PI, cuando la realidad es que eliminan cargas virales muy altas (Lanyon et al., 2014). En este sentido, algunos autores afirman que para detectar animales PI, en la técnica *Real time*, el Ct debería considerarse

hasta 28,9. Sin embargo plantean que podría haber un sub-diagnóstico de algunos PI. En ese trabajo obtuvieron un Ct entre 19 y 29 para muestras de animales PI y Ct entre 30 y 41 para animales con infección aguda de DVB (Hanon et al., 2014). En contraste, otros autores obtuvieron Ct entre 32 y 37 para muestras de animales PI (Edgar Valdez et al., 2018). Frente a esto, nos preguntamos si es que estamos frente a muestras de animales PI con bajas cargas virales o si es que se necesitan ajustes metodológicos, por ejemplo: si la región del genoma utilizada es la adecuada para cuantificar VDVB, si al usar un kit comercial para la extracción de ARN podemos estar obteniendo concentraciones muy bajas de ARN y ahí estar “perdiendo” ARN de la muestra inicial.

Teóricamente, en ddPCR, la reacción de la muestra (20 µl) se subdivide en 20.000 gotas. Sin embargo, durante el análisis y la preparación se pueden perder gotas, fundamentalmente por las características intrínsecas del ensayo. Según recomendaciones de “The Digital MIQE Guidelines”, la cantidad de gotas mínimas en las cuales se debe particionar la muestra es de 10.000 gotas, para lograr un resultado validado por la técnica y obtener el número de copias final de esa muestra (Pinheiro-de-oliveira et al., 2018b). De acuerdo a Hayden et al. (2013), la cuantificación absoluta directa a tiempo final que brinda la ddPCR tiene ventajas económicas una vez que se haya adquirido el equipo, ya que no es necesario realizar curvas de calibración. *Droplet Digital PCR* también es una herramienta con potencial utilidad en la caracterización de la dinámica de poblaciones microbianas a partir de muestras complejas del ambiente (Kim et al., 2014). En varios trabajos de investigación se demuestra que es una herramienta más flexible en cuanto a la calidad de la muestra y menos sensible a los inhibidores que generalmente se encuentran en las PCR (Verhaegen et al., 2016). En un trabajo con *Salmonella* en leche, las cantidades de calcio y etanol afectaron la inhibición de la *Real time PCR* a más de 5,5 mM o 1,5%. Sin embargo, esta inhibición no fue significativa en la *Droplet Digital PCR* (Wang et al., 2018a). Hablando de muestras complejas, la técnica *Droplet Digital PCR* de la presente tesis, logró detectar el virus hasta la dilución -5 en leche. En la PCR convencional se logró detectar el virus hasta la dilución -2 en leche y hasta la dilución -3 en agua DEPC. Resultados obtenidos por Kosinova et al. (2007), donde analizaron también muestras de leche de tanque por qPCR, los valores oscilaron en el orden de 10^1 - 10^2 cDNA/VDVB copias/µl, utilizando la región 5'UTR para detectar el genoma de DVB. Esto es similar a nuestros resultados obtenidos por PCR convencional, pero vemos que la técnica *Droplet Digital PCR* podría llegar a ser de mayor sensibilidad y límite de detección por estos resultados preliminares que de todas maneras deberían ser analizados en mayor profundidad en futuros estudios.

A su vez, podríamos comparar estos resultados con los obtenidos por Drew et al. (1999) en Inglaterra, donde se analizaron muestras de leche de tanque de 80 establecimientos mediante ELISA anticuerpos y RT-PCR utilizando la región 5'UTR. En este trabajo los resultados fueron 16/77 (20,5%) positivos por RT-PCR en el cual observaron se correlacionaba con los resultados de altos niveles de anticuerpos en leche de tanque. Sin embargo, en 86 establecimientos como grupo control, los cuales no tenían historia previa de DVB, pero sí tenían resultados de bajos niveles de anticuerpos en leche de tanque, los resultados por RT-PCR fueron todos negativos. En el estudio afirman que ningún

establecimiento utilizaba vacunas para DVB. Esto nos puede dar lugar a cuestionar si puede que la sensibilidad de esta técnica no haya sido suficiente para detectar genoma de DVB en leche de tanque en esos establecimientos.

En otro orden, y a partir del título viral obtenido por el método de *Reed y Muench* ($10^{5.17}$ DICC 50%/50 μ l), se calculó que la muestra de la cual se partió para este ensayo tenía 2958 unidades infectantes/ μ l. Si se compara estos datos (calculados teóricamente) con las copias virales/ μ l obtenidas por la técnica *Droplet Digital PCR* el virus DVB en agua DEPC, se observa que para el virus DVB puro (control positivo, 1500 ng/ μ l) se cuantificaron 888 copias/ μ l y por el método calculado fueron 2958 copias/ μ l. Luego y para las diluciones en base 10, los valores fueron: 145 copias/ μ l ddPCR y 295,8 copias/ μ l calculadas teóricamente en la dilución -1. La siguiente sería 28,2 copias/ μ l ddPCR y 29,6 copias/ μ l teóricas (-2); 1,7 copias/ μ l ddPCR y 2,9 copias/ μ l teóricas (-3). Como se puede observar, a medida que se fue diluyendo la muestra, el número de copias virales fue más concordante entre las copias obtenidas por ddPCR y las calculadas a partir de la titulación en cultivo celular. Sin embargo y a pesar de ello, en términos generales los resultados indican que existen diferencias entre ambos métodos de cuantificación viral. Uno de los principales factores que pueden explicar estas diferencias es el hecho de que la ddPCR cuantifica genomas virales totales, mientras que titulación en cultivo celular se basa en la capacidad infectiva del virus. Esto permitiría asumir que las copias cuantificadas por la ddPCR, debería ser mucho mayores a las copias obtenidas por cultivo celular, ya que este último depende de la capacidad infectante, o sea de la integridad de la partícula viral y su capacidad de multiplicación en células susceptibles. Sin embargo, los resultados fueron en sentido inverso. Se logró mayor cuantificación por cultivo celular que por ddPCR, sobre todo en las muestras más concentradas. Este resultado no presenta a priori una lógica biológica, por lo que la única conclusión válida con los resultados obtenidos, es que no presenta coherencia la cuantificación por ambos métodos.

También se pudo observar, a partir de los resultados obtenidos por la técnica *Droplet Digital PCR* en los ensayos del virus DVB en leche ultrapasteurizada UHT y en agua DEPC, diferencias en la detección del virus. En la leche se detectó una menor detección de copias virales, tal vez por cierta inhibición en la PCR por la composición de la leche. La leche es una matriz compleja y heterogénea compuesta por un sistema coloidal de tres fases: en solución (minerales y glúcidos), en suspensión (sustancias proteicas) y en emulsión (grasa), lo cual a veces resulta compleja tanto para métodos de extracción ARN y el diagnóstico molecular (Secchi, 2009). De todas maneras, estos ensayos deben ser repetidos nuevamente, ya que en el presente trabajo no se logró estandarizar correctamente la técnica del virus de DVB en leche, por la dificultad en la obtención mínima de las gotas necesarias para validar el método. Como hemos comentado anteriormente, un paso crucial en el desarrollo de esta técnica es la formación de gotas, las cuales se forman en el tercer pocillo del cartucho (Fig.4) en el equipo QX200 “Generador de Gotas” (Bio-Rad #186-4002). Luego deben colocarse cuidadosamente en la Placa de 96 pocillos. Al margen de esto, es importante señalar que existen publicaciones realizadas que utilizan esta técnica *Droplet Digital PCR* para detectar otros patógenos, como *Bacillus cereus* en leche pasteurizada UHT, y comparan resultados con

Real time PCR (Porcellato et al., 2016). El límite de detección encontrado en este caso fue de 8,4 +- 2,2 copias/ reacción en ddPCR y 49 copias/reacción en qPCR. A su vez, también los autores destacan que la qPCR se demuestra más afectada por inhibidores de la PCR que la ddPCR, y que eso está dado por la partición de la reacción de PCR en gotas, lo cual reduce la exposición a los inhibidores de la PCR. Esta conclusión es compartida por otros autores que obtuvieron similares resultados al cuantificar *Salmonella typhimurium* en leche y logrando una cuantificación absoluta cuando las concentraciones son mayores a 1 ng/μl o 10E6 UFC/ ml (Wang et al., 2018b).

Finalmente, con respecto al análisis realizado para estudiar la variabilidad genética de DVB de las muestras utilizadas en este trabajo, observamos que al igual que en otras investigaciones el genotipo VDVB-1 es el genotipo más prevalente con una frecuencia de 94,3% (33/35) de las muestras de suero bovino y las muestras de los dos animales persistentemente infectados (BVD37 y BVD38), mientras que el genotipo VDVB-2 representó un 5,7% (2/35), correspondientes a las muestras BVD2 y BVD13. Esto fue muy similar al resultado obtenido por Maya et al. (2016b), donde VDVB-1 presentó una frecuencia de 92,9% (13/14) y VDVB-2 un 7,1% (1/14). La región secuenciada en este trabajo fue la región 5'UTR del genoma de VDVB (amplicón de 207 pb), siguiendo referencias bibliográficas que se han publicado anteriormente para realizar diagnóstico y cuantificación de VDVB con estas técnicas moleculares (da Silva Silveira et al., 2020; Dias et al., 2017; Kosinova et al., 2007; Maya et al., 2016a; Robesova et al., 2009; Š. Vilček et al., 2001; Zoccola et al., 2017). Sin embargo, en el año 2021, se publicó un trabajo realizado por un equipo de la Universidad Federal de Santa María (Río Grande do Sul, Brasil) donde se discute o plantea cuál sería el gen a elegir para la subtipificación de VDVB (de Oliveira et al., 2021). A partir del análisis del genoma completo de la región 5'UTR, región 3'UTR y 12 genes individuales, observaron que al menos 2 secuencias (BVDV-1q y BVDV-1e) se agruparon en forma separada en la filogenia basada en 5'UTR y NS4A respectivamente. Lo mismo ocurrió para BVDV-2, donde no se pudieron clasificar 4 secuencias de BVDV-2a a partir del análisis de 5'UTR. Al igual que para BVD-1, las regiones UTR, presentaron mayores discordancias que las regiones codificantes cuando se comparó con el GC. En base a la distancia geodésica, NS4B para el BVD-1 y la NS5A para BVD-2 son los mejores marcadores, tienen las longitudes más cercanas al análisis del genoma completo para el subtipificado de este virus. Por lo tanto, la utilización de estos genes individuales, minimizan errores de subtipificación y deberían ser implementados futuramente en estas muestras para confirmar los resultados obtenidos en el presente trabajo. Por último, las muestras de DVB obtenidas a partir de vacunas comerciales (BVD32, BVD35, BVD36), se agruparon en el cluster VDVB-1. El objetivo de analizar estas vacunas se realizó para evaluar si los genotipos utilizados en las vacunas son o se corresponden a los genotipos que circulan en nuestro país en mayor porcentaje. Al observar los resultados obtenidos, vemos que el genotipo VDVB-2 no fue detectado en las cepas vacunales. Sin embargo, debe considerarse que la filogenia se infiere a partir de una única región parcial (5'UTR). En este sentido, esta región es altamente conservada y no lo suficientemente variable para la subtipificación de DVB; deberían realizarse

posteriores estudios utilizándose otros genes y/o regiones del genoma, de mayor variabilidad genética para el subtipificado (subgenotipos) como menciona Oliveira et al. (2021). De esta manera, analizar los genes que codifican para las proteínas más inmunogénicas del virus, y así poder comparar la homología antigénica entre las cepas de campo y las cepas vacunales. VDVB posee glicoproteínas que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes siendo la glicoproteína E2 la inmunodominante (Pedrera et al 2008). La presencia de anticuerpos neutralizantes en VDVB es detectable en suero 2 a 4 semanas post-infección, dependiendo de la cepa involucrada, manteniéndose hasta las 10-12 semanas aproximadamente, o bien persistiendo durante toda la vida del animal (Fredriksen et al., 1999).

La gran variabilidad genética que presenta el VDVB plantea una serie de desafíos para la eficacia y la seguridad de las vacunas. La mayoría de las vacunas actualmente son multivalentes, incluyendo el VDVB-1 y VDVB-2, junto con otras cepas de enfermedades reproductivas o virus respiratorias del ganado bovino (Newcomer et al., 2017).

La vacunación contra VDVB en Uruguay no es obligatoria ni tampoco existe un plan oficial voluntario de control para mitigar las pérdidas que produce. Tampoco existen al momento, estudios que evalúen la eficacia de las vacunas en cuanto a su capacidad de producir anticuerpos neutralizantes. A su vez, es bajo el porcentaje de productores que vacunan en nuestro país según datos de otros autores; de 230 establecimientos, solo el 3% vacunaban en ese momento (Guarino et al., 2008).

8. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación, por primera vez en Uruguay se analizan y se comparan resultados de técnicas moleculares de diagnóstico para la detección y cuantificación del virus de la DVB: PCR convencional, *Real time* PCR y *Droplet Digital* PCR.

Se logra demostrar y afirmar lo presentado en otras publicaciones: la técnica *Droplet Digital* PCR es una herramienta molecular con mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad que las técnicas existentes para el diagnóstico y cuantificación, en este caso para el virus de la Diarrea Viral bovina.

A su vez, el análisis filogenético realizado a las muestras de suero bovino que comprenden este trabajo, son un aporte y avances en la epidemiología molecular de este virus, reafirmando que el genotipo BVDV-1 tiene mayor prevalencia en nuestro país.

Se necesitan realizar más ensayos para determinar el límite de detección en leche del virus de DVB con *Droplet Digital* PCR. En este sentido, sería interesante como se comentó, realizar proyectos de investigación utilizando leche de tanque donde existe un pool de muestras de todo el rodeo para detectar precozmente la circulación viral de DVB en el rodeo.

En conclusión, la técnica *Droplet Digital* PCR, es una herramienta molecular prometedora y se deberá continuar realizando estudios de investigación en DVB para mayores avances y herramientas para futuros programas de control de esta enfermedad. Sería relevante para el sector productivo lechero lograr detectar precozmente DVB en el rodeo mediante muestras colectivas de leche, que en última instancia se traduzcan también en menores costos para un programa de control eficiente.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abachin, E., Convers, S., Falque, S., Esson, R., Mallet, L., & Nougarede, N. (2018). Comparison of reverse-transcriptase qPCR and droplet digital PCR for the quantification of dengue virus nucleic acid. *Biologicals*, 52(May 2017), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2018.01.001>
2. Alikian, M., Whale, A. S., Akiki, S., Piechocki, K., Torrado, C., Myint, T., Cowen, S., Griffiths, M., Reid, A. G., Apperley, J., White, H., Huggett, J. F., & Foroni, L. (2017). RT-qPCR and RT-digital PCR: A comparison of different platforms for the evaluation of residual disease in chronic myeloid leukemia. *Clinical Chemistry*, 63(2), 525–531. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.262824>
3. Alteri, C., Cento, V., Antonello, M., Colagrossi, L., Merli, M., Ughi, N., Renica, S., Matarazzo, E., Ruscio, F. Di, Tartaglione, L., Colombo, J., Grimaldi, C., Carta, S., Nava, A., Costabile, V., Baiguera, C., Campisi, D., Fanti, D., Vismara, C., ... Perno, C. F. (2020). Detection and quantification of SARS-CoV-2 by droplet digital PCR in real-time PCR negative nasopharyngeal swabs from suspected COVID-19 patients. *PLoS ONE*, 15(9 September), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236311>
4. Arbulú-García, C., & Morales-Cauti, S. (2021). Seroprevalence of antibodies against bovine viral diarrhoea virus in cattle under an extensive production system in three districts of Ayacucho, Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 32(3), 1–9. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I3.20401>
5. Bachofen, C., Braun, U., Hilbe, M., Ehrensperger, F., Stalder, H., & Peterhans, E. (2010). Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Veterinary Microbiology*, 141(3–4), 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.022>
6. Barcu, J. (2020). Diagnostics and risk factors for bovine respiratory disease. Tesis de doctorado. Kansas State University. Manhattan, Kansas. 240p.
7. Bartenschlager, R., & Volker, L. (2000). Replication of Hepatitis C Virus. *Journal of General Virology*, 2000, 1631–1648. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0881-3.00007-3>
8. Bateman, A. C., Greninger, A. L., Atienza, E. E., Limaye, A. P., Jerome, K. R., & Cook, L. (2017). Quantification of BK virus standards by quantitative real-time PCR and droplet digital PCR is confounded by multiple virus populations in the WHO BKV international standard. *Clinical Chemistry*, 63(3), 761–769. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.265512>
9. Bauermann, F. V., Flores, E. F., & Ridpath, J. F. (2012). *Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus : Possible impacts on diagnosis and control*. <https://doi.org/10.1177/1040638711435144>
10. Beaver, J. A., Jelovac, D., Balukrishna, S., Cochran, R., Zabransky, D. J., Wong, H. Y., Toro, P. V., Blair, B. G., Chu, D., Burns, T., Higgins, M. J., Jacobs, L., Habibi, M., Lange, J., Hurley, P. J., Luring, J., Vandenberg, D., Kessler, J., Jeter, S., ... Ben, H. (2015). Detection of Cancer DNA in Plasma of early stage breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 20(June 2013), 2643–2650. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2933.Detection>
11. Bitsch, V., & Rønsholt, L. (1995). Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 11(3), 627–640. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30471-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30471-0)
12. Booth, R. E., & Brownlie, J. (2012). Paper: Establishing a pilot bovine viral diarrhoea virus eradication scheme in Somerset. *Veterinary Record*, 170(3), 73.

- <https://doi.org/10.1136/vr.100191>
13. Borel, N., Janett, F., Teankum, K., Zlinszky, K., Iten, C., & Hilbe, M. (2007). Testicular Hypoplasia in a Bull Persistently Infected with Bovine Diarrhoea Virus. *Journal of Comparative Pathology*, *137*(2–3), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.06.002>
 14. Brownlie, J., Hooper, L. B., Thompson, I., & Collins, M. E. (1998). Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) - The bovine pestivirus. *Clinical and Diagnostic Virology*, *10*(2–3), 141–150. [https://doi.org/10.1016/S0928-0197\(98\)00030-0](https://doi.org/10.1016/S0928-0197(98)00030-0)
 15. Bruschke, C. J., Hulst, M. M., Moormann, R. J., van Rijn, P. A., & van Oirschot, J. T. (1997). Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *Journal of Virology*, *71*(9), 6692–6696. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.9.6692-6696.1997>
 16. Burbano, H., Vera, V., & Ramírez, G. (2006). Detección de biotipos del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) a través de RT-PCR¹. *Revista de Medicina Veterinaria*, 7–14.
 17. da Silva Silveira, C., Maya, L., Casaux, M. L., Schild, C., Caffarena, D., Aráoz, V., da Costa, R. A., Macías-Rioseco, M., Perdomo, Y., Castells, M., Colina, R., Fraga, M., Riet-Correa, F., & Giannitti, F. (2020). Diseases associated with bovine viral diarrhoea virus subtypes 1a and 2b in beef and dairy cattle in Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(1), 357–368. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00170-7>
 18. De Brun, M. L., Cosme, B., Petersen, M., Alvarez, I., Folgueras-Flatschart, A., Flatschart, R., Panei, C. J., & Puentes, R. (2022). Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 104063872210855. <https://doi.org/10.1177/10406387221085581>
 19. de Oliveira, P. S. B., Silva Júnior, J. V. J., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2021). Subtyping bovine viral diarrhoea virus (BVDV): Which viral gene to choose? *Infection, Genetics and Evolution*, *92*(May). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104891>
 20. Dias, R. K., Cargnelutti, J. F., Weber, M. N., Canal, C. W., Bauermann, F. V., Ridpath, J. F., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2017). Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. *Veterinary Microbiology*, *203*, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.021>
 21. Drew, T. W., Yapp, F., & Paton, D. J. (1999). The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Veterinary Microbiology*, *64*(2–3), 145–154. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00266-1)
 22. Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, *5*, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
 23. Edgar Valdez, G., Ignacio Pacheco, P., Walter Vergara, A., Juan Pinto, L., Fiorela Fernández, B., Fiorela Guzmán, F., Dennis Navarro, M., & Hermelinda Rivera, G. (2018). Identification of persistently infected cattle and genotype of bovine viral diarrhoea virus in cattle of Anta, Cusco, Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *29*(4), 1527–1537. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15192>
 24. Eigen, M., Gardiner, W., Schuster, P., & Winkler-Oswatitsch, R. (1981). The origin of genetic information. *Scientific American*, *244*, 88–92.
 25. Flatschart, R. B., Almeida, D. O., Heinemann, M. B., Medeiros, M. N., Granjeiro, J. M., & Folgueras-Flatschart, A. V. (2013). Absolute quantification of bovine viral

- diarrhea virus (BVDV) RNA by the digital PCR technique. *Journal of Physics: Conference Series*, 575(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/575/1/012038>
26. Flores, E. F., Ridpath, J. F., Weiblen, R., Vogel, F. S. F., & Gil, L. H. V. G. (2002). Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: Evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Research*, 87(1), 51–60. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00080-1)
 27. Fredriksen, B., Sandvik, T., Løken, T., & Ødegaard, S. A. (1999). Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record*, 144(5), 111–114. <https://doi.org/10.1136/vr.144.5.111>
 28. Fulton, R. W., Saliki, J. T., Confer, A. W., Burge, L. J., d'Offay, J. M., Helman, R. G., Bolin, S. R., Ridpath, J. F., & Payton, M. E. (2000). Bovine viral diarrhea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, 12(1), 33–38. <https://doi.org/10.1177/104063870001200106>
 29. Gamlen, T., Richards, K. H., Mankouri, J., Hudson, L., McCauley, J., Harris, M., & Macdonald, A. (2010). Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. *Journal of General Virology*, 91(1), 133–144. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016170-0>
 30. Gollán, A., Chimeno Zoth, S. A., Piccone, M. E., Mariño, B., Peralta, C., Rodrez Armesto, R., & Occhi, H. (2006). Aislamiento y caracterización del virus de la diarrea viral bovina en un ternero con síndrome purpúrico. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2), 167–173. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2006000200011>
 31. Gottems, L. (2018). Nova vacina combate a diarréia viral bovina. Disponible en: <https://www.agrolink.com.br/noticias/nova-vacina-combate-a-diarreia-viral-bovina-404791.html>. Fecha de consulta: 16.05.22
 32. Grooms, D. L. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 20(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.006>
 33. Guarino, H., Núñez, A., Repiso, M. V., Gil, A., & Dargatz, D. A. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. *Preventive Veterinary Medicine*, 85(1–2), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.12.012>
 34. Hanon, J. B., Van der Stede, Y., Antonissen, A., Mullender, C., Tignon, M., van den Berg, T., & Caij, B. (2014). Distinction between persistent and transient infection in a bovine viral diarrhoea (bvd) control programme: Appropriate interpretation of real-time RT-PCR and Antigen-ELISA test results. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(2), 156–162. <https://doi.org/10.1111/tbed.12011>
 35. Hayden, R. T., Gu, Z., Ingersoll, J., Abdul-Ali, D., Shi, L., Pounds, S., & Caliendo, A. M. (2013). Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 540–546. <https://doi.org/10.1128/JCM.02620-12>
 36. Henrich, T. J., Gallien, S., Li, J. Z., Pereyra, F., & Kuritzkes, D. R. (2012). Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR. *Journal of Virological Methods*, 186(1–2), 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.08.019>
 37. Heuer, C., Healy, A., & Zerbini, C. (2007). Economic effects of exposure to bovine

- viral diarrhea virus on dairy herds in New Zealand. *Journal of Dairy Science*, 90(12), 5428–5438. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0258>
38. Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., ... Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
 39. Houe, H. (1995). Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 11(3), 521–547. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30465-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30465-5)
 40. Houe, H., Lindberg, A., & Moennig, V. (2006). Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(5), 427–436. <https://doi.org/10.1177/104063870601800501>
 41. Houe, H., & Meyling, A. (1991). Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Preventive Veterinary Medicine*, 11(1), 9–16. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(05\)80040-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(05)80040-6)
 42. Houe, Hans. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, 64(2–3), 89–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00262-4)
 43. Huaman G. Juan. (2006). Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina, y animales persistentemente infectados con el virus, en hatos productores de leche de la irrigación de Majes, Arequipa. *Tesis. Universidad Nacional de San Marcos*, 44.
 44. Hui, Y., Wu, Z., Qin, Z., Zhu, L., Liang, J., Li, X., Fu, H., Feng, S., Yu, J., He, X., Lu, W., Xiao, W., Wu, Q., Zhang, B., & Zhao, W. (2018). Micro-droplet Digital Polymerase Chain Reaction and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Technologies Provide Highly Sensitive and Accurate Detection of Zika Virus. *Virologica Sinica*, 33(3), 270–277. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0037-y>
 45. ICTV (2021) Genus: Pestivirus – Flaviviridae - positive-sense RNA viruses – ICTV. URL: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus Fecha de consulta: 20.10.21.
 46. INTA (2018) Presentan la primera vacuna contra la diarrea viral bovina. Disponible en: <https://intainforma.inta.gob.ar/presentan-la-primera-vacuna-contra-la-diarrea-viral-bovina/>. Fecha de consulta: 04.04.2022.
 47. Isoda, N., Asano, A., Ichijo, M., Ohno, H., Sato, K., Okamoto, H., Nakao, S., Kato, H., Saito, K., Ito, N., Usui, A., Takayama, H., & Sakoda, Y. (2019). Assessment of the cost effectiveness of compulsory testing of introduced animals and bulk tank milk testing for bovine viral diarrhea in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(4), 577–585. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0671>
 48. Jaworski, J. P., Pluta, A., Rola-Luszczak, M., McGowan, S. L., Finnegan, C., Heenemann, K., Carignano, H. A., Alvarez, I., Murakami, K., Willems, L., Vahlenkamp, T. W., Trono, K. G., Choudhury, B., & Kuźmak, J. (2018). Interlaboratory comparison of six real-time PCR assays for detection of bovine leukemia virus proviral DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(7). <https://doi.org/10.1128/JCM.00304-18>
 49. Jones, M., Williams, J., Gärtner, K., Phillips, R., Hurst, J., & Frater, J. (2014). Low

- copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, “definetherain.” *Journal of Virological Methods*, 202, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.020>
50. Kennedy, J. A. (2006). Diagnostic efficacy of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to screen cattle for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(9), 1472–1474. <https://doi.org/10.2460/javma.229.9.1472>
 51. Khodakaram-Tafti, A., & Farjanikish, G. H. (2017). Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(3), 154–163. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2017.4190>
 52. Kim, T. G., Jeong, S. Y., & Cho, K. S. (2014). Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 6105–6113. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5794-4>
 53. Kosinova, E., Psikal, I., Robesova, B., & Kovarcik, K. (2007). Real-time PCR for quantitation of bovine viral diarrhoea virus RNA using SYBR Green I fluorimetry. *Veterinarni Medicina*, 52(6), 253–261. <https://doi.org/10.17221/1882-VETMED>
 54. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 55. Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P., & Brownlie, J. (2014). Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Journal*, 199(2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>
 56. Lanyon, S. R., & Reichel, M. P. (2014). Bovine viral diarrhoea virus ('pestivirus') in Australia: To control or not to control? *Australian Veterinary Journal*, 92(8), 277–282. <https://doi.org/10.1111/avj.12208>
 57. Liebler-Tenorio, E. M., Ridpath, J. F., & Neill, J. D. (2004). Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16(5), 388–396. <https://doi.org/10.1177/104063870401600504>
 58. Littledike, E. T., Bolin, S. R., Ridpath, J. F., Littledike, E. T., Bolin, S. R., & Ridpath, J. F. (1993). *Digital Commons @ University of Nebraska - Lincoln Consequences of Antigenic Diversity of Bovine Viral Diarrhoea Virus*.
 59. Liu, L., Xia, H., Wahlberg, N., Belák, S., & Baule, C. (2009). Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*, 385(2), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.004>
 60. Lui, Y. L. E., & Tan, E. L. (2014). Droplet digital PCR as a useful tool for the quantitative detection of Enterovirus 71. *Journal of Virological Methods*, 207, 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.014>
 61. Macchi, V., Fernandez, F., Gil, A., & Suanes, A. (2018). Seroprevalencia de enfermedades que afectan la reproducción en bovinos en Uruguay, su evolución y relación con la vacunación Instituciones participantes. Disponible en: <http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20Tacuaremb%C3%B3/2018/Destacada%20VI%20jornada%20salud%20bovinos/Jueves/Din%C3%A1mica%20poblacional%20Dr.%20Federico%20Fern%C3%A1ndez.pdf>. Fecha de consulta: 26.04.22.
 62. Machado, G., Egocheaga, R. M. F., Hein, H. E., Miranda, I. C. S., Neto, W. S., Almeida, L. L., Canal, C. W., Stein, M. C., & Corbellini, L. G. (2016). Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in Dairy Cattle: A Matched Case-Control Study. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(1), e1–e13.

- <https://doi.org/10.1111/tbed.12219>
63. Marshall, D. J., Moxley, R. A., & Kelling, C. L. (1996). Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Pathology*, 33(3), 311–318. <https://doi.org/10.1177/030098589603300308>
 64. Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H.-J., & Rumenapf, T. (2004). CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Journal of Virology*, 78(4), 1792–1799. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.4.1792-1799.2004>
 65. Maya, L., Puentes, R., Reolón, E., Acuña, P., Riet, F., Rivero, R., Cristina, J., & Colina, R. (2016a). Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Archives of Virology*, 161(3), 529–535. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2688-4>
 66. Maya, L., Puentes, R., Reolón, E., Acuña, P., Riet, F., Rivero, R., Cristina, J., & Colina, R. (2016b). Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Archives of Virology*, 161(3), 529–535. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2688-4>
 67. McGowan, M. R., Kikland, P. D., Richards, S. G., & Littlejohns, I. . (1993). Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *The Veterinary Record*, 10, 39–43.
 68. Mederos, A., & Hirigoyen, D. (1997). XXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría - Relevamiento epidemiológico de diarrea viral bovina, rinotraqueítis infecciosa bovina y leucosis bovina en predios lecheros en Uruguay. *Jornadas Uruguayas de Buiatría*, 19–20.
 69. Meyers, G., & Thiel. (1996). Molecular characterization of pestiviruses (Vol. 47). *Advances in Virus research*.
 70. Meyling, A., Houe, H., & Jensen, A. M. (1990). Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 9(1), 75–93. <https://doi.org/10.20506/rst.9.1.489>
 71. Mionetto, M., & Rodríguez, F. (2018). Asociación entre leucosis bovina enzootica y la respuesta inmune humoral natural contra enfermedades infecciosas y de interés reproductivo. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 49p.
 72. Nagai, M., Hayashi, M., Sugita, S., Sakoda, Y., Mori, M., Murakami, T., Ozawa, T., Yamada, N., & Akashi, H. (2004). Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus Research*, 99(2), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.10.006>
 73. Newcomer, B. W., Chamorro, M. F., & Walz, P. H. (2017). Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*, 206(December 2016), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.003>
 74. Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559–1582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
 75. Nuñez, A., Gil, A., Guarino, A., Sienra, A., Piaggio, J., & Zaffaroni, R. (2000). *Estudio de seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en rodeos lecheros d Florida, Uruguay*.
 76. Olmedillas-López, S., García-Arranz, M., & García-Olmo, D. (2017). Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 21(5), 493–510. <https://doi.org/10.1007/s40291-017-0278-8>
 77. Olsson, M., Kierczak, M., Karlsson, Jablonska, J., Leegwater, P., Koltookian, M., Abadie, J., Dufaure De Citres, C., Thomas, A., Hedhammar, Tintle, L., Lindblad-Toh, K., & Meadows, J. R. S. (2016). Absolute quantification reveals the stable transmission of a high copy number variant linked to autoinflammatory disease. *BMC Genomics*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2619-0>

78. Otonel, R. A. A., Alfieri, A. F., Dezen, S., Lunardi, M., Headley, S. A., & Alfieri, A. A. (2014). The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1), 87–92. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0451-y>
79. Paton, D. J. (1995). Pestivirus diversity. *Journal of Comparative Pathology*, 112(3), 215–236. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(05\)80076-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(05)80076-3)
80. Pecora, Andrea & Perez A., M. S. (2017). Actualización en diarrea viral bovina , herramientas diagnósticas y estrategias de prevención. *INTA-Buenos Aires Argentina.*, 4–24.
81. Pecora, A., Pérez Aguirreburualde, M. S., Malacari, D. A., Zabal, O., Sala, J. M., Konrad, J. L., Caspe, S. G., Bauermann, F., Ridpath, J., & Dus Santos, M. J. (2017). Serologic evidence of HoBi-like virus circulation in Argentinean water buffalo. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(6), 926–929. <https://doi.org/10.1177/1040638717720246>
82. Pedrera, M., Gómez-Villamandos, J. C., Risalde, M. A., Molina, V., & Sánchez-Cordón, P. J. (2012). Characterization of Apoptosis Pathways (Intrinsic and Extrinsic) in Lymphoid Tissues of Calves Inoculated with Non-cytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus Genotype-1. *Journal of Comparative Pathology*, 146(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.03.015>
83. Pinheiro-de-oliveira, T. F., Fonseca, A. A., Camargos, M. F., Laguardia-nascimento, M., Oliveira, A. M. De, & Cottorello, A. C. P. (2018a). *Development of a droplet digital RT-PCR for the quanti fi cation of foot-and- mouth virus RNA*. 259(August 2017), 129–134.
84. Pinheiro-de-oliveira, T. F., Fonseca, A. A., Camargos, M. F., Laguardia-nascimento, M., Oliveira, A. M. De, & Cottorello, A. C. P. (2018b). *Development of a droplet digital RT-PCR for the quanti fi cation of foot-and- mouth virus RNA*. 259(June), 129–134.
85. Pizarro-Lucero, J., Celedón, M. O., Aguilera, M., & de Calisto, A. (2006). Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Veterinary Microbiology*, 115(1–3), 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.009>
86. Porcellato, D., Narvhus, J., & Skeie, S. B. (2016). Detection and quantification of *Bacillus cereus* group in milk by droplet digital PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.012>
87. Presi, P., Struchen, R., Knight-Jones, T., Scholl, S., & Heim, D. (2011). Bovine viral diarrhoea (BVD) eradication in Switzerland-Experiences of the first two years. *Preventive Veterinary Medicine*, 99(2–4), 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.01.012>
88. Quinn, H. E., Windsor, P. A., Kirkland, P. D., & Ellis, J. T. (2004). An outbreak of abortion in a dairy herd associated with *Neospora caninum* and bovine pestivirus infection. *Australian Veterinary Journal*, 82(1–2), 99–101. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2004.tb14656.x>
89. Ramakrishnan, M. A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World Journal of Virology*, 5(2), 85–87. <https://doi.org/10.1037/h0063767>
90. Reinhardt, G., Ochoa, C. A., Tadich, N., & Riedemann, S. (2003). Utilización del Método de Elisa en la detección directa de antígeno de virus diarrea viral bovina en muestras de suero sanguíneo de bovinos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 35(1), 89–93.
91. Repiso, M. V, Gil, A., Fernandez, L., Guarino, H., Herrera, B., Olivera, M., Osawa, T., & Silva, M. (2005). Prevalencia De Las Principales Enfermedades Infecciosas Que Afectan El Comportamiento Reproductivo En La Ganaderia De Carne Y

- Caracterización De Los Establecimientos De Cría Del Uruguay. *Fpta N°13*, 40(157), 5–28.
92. Richter, V., Lebl, K., Baumgartner, W., Obritzhauser, W., Käsbohrer, A., & Pinior, B. (2017). A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Veterinary Journal*, 220(June 2016), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.005>
 93. Ridpath, J. F. (2003). BVDV genotypes and biotypes: Practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, 31(2), 127–131. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00028-9)
 94. Ridpath, J. F. (2010). Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 26(1), 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.007>
 95. Ridpath, J. F., & Bolin, S. R. (1998). Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 12(2), 101–106. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0158>
 96. Ridpath, J. F., Roblin, S. R., & Dubovi, E. J. (1994). Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes (pp. 66–74).
 97. Rivera G., H. (2012). Evolución del Conocimiento sobre la enfermedad de la diarrea viral bovina y su agente etiológico. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 19(2), 93–112. <https://doi.org/10.15381/rivep.v19i2.1071>
 98. Robesova, B., Kovarcik, K., & Vilcek, S. (2009). Genotyping of bovine viral diarrhoea virus isolates from the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*, 54(9), 393–398. <https://doi.org/10.17221/3053-vetmed>
 99. Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Rivera-Arroyo, B., Martínez-López, B., de las Heras, A. I., Sánchez-Vizcaíno, J. M., & Vicente, J. (2016). Evidence of shared bovine viral diarrhoea infections between red deer and extensively raised cattle in south-central Spain. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0630-3>
 100. Rweyemamu, M., Fernández, A., Espinosa, A., Sschudel, A., Lager, I., & Mueller, S. (1990). Incidencia, epidemiología y control de la diarrea viral bovina en América del Sur. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 9(1), 215–221. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(93\)90048-W](https://doi.org/10.1016/0077-7579(93)90048-W)
 101. Saizar, J., & Gil, A. (1998). Estudio serológico de la diarrea viral bovina en Uruguay. XXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría.
 102. Schirrmeier, H., Strebelow, G., Depner, K., Hoffmann, B., & Beer, M. (2004). Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *Journal of General Virology*, 85(12), 3647–3652. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80238-0>
 103. Secchi, S. (2009). Comparación de cuatro kits comerciales de extracción de ARN bacteriano a partir de muestras de leche. XIII Jornadas de Producción Animal, 66–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00100-2>
 104. Sprecher, D., Baker, J., Holland, R., & Yamini, B. (1991). An outbreak of fetal and neonatal losses associated with the diagnosis of bovine viral diarrhoea virus in a dairy herd. *Theriogenology*, 36(4), 597–606.
 105. Urse, J. M. (2016). Control de calidad de vacunas de uso en animales de producción. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 122p.
 106. Verhaegen, B., De Reu, K., De Zutter, L., Verstraete, K., Heyndrickx, M., & Van Coillie, E. (2016). Comparison of droplet digital PCR and qPCR for the quantification of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine feces. *Toxins*, 8(5), 1–11. <https://doi.org/10.3390/toxins8050157>

107. Vilcek, S., Durkovic, B., & Kolesarova, M. (2005). *Genetic diversity of BVDV : Consequences for classification and molecular epidemiology*. 72, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.004>
108. Vilček, S., Herring, A. J., Herring, J. A., Nettleton, P. F., Lowings, J. P., & Paton, D. J. (1994). Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology*, 136(3–4), 309–323. <https://doi.org/10.1007/BF01321060>
109. Vilček, S., Paton, D. J., Durkovic, B., Strojny, L., Ibata, G., Moussa, A., Loitsch, A., Rossmanith, W., Vega, S., Scicluna, M. T., & Palfi, V. (2001). Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archives of Virology*, 146(1), 99–115. <https://doi.org/10.1007/s007050170194>
110. Wang, M., Yang, J., Gai, Z., Huo, S., Zhu, J., Li, J., Wang, R., Xing, S., Shi, G., Shi, F., & Zhang, L. (2018a). Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 266(November 2017), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.011>
111. Wang, M., Yang, J., Gai, Z., Huo, S., Zhu, J., Li, J., Wang, R., Xing, S., Shi, G., Shi, F., & Zhang, L. (2018b). Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 266(November 2017), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.011>
112. Wu, X., Lin, H., Chen, S., Xiao, L., Yang, M., An, W., Wang, Y., Yao, X., & Yang, Z. (2017). Development and application of a reverse transcriptase droplet digital PCR (RT-ddPCR) for sensitive and rapid detection of Japanese encephalitis virus. *Journal of Virological Methods*, 248(May), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.06.015>
113. Yang, R., Papparini, A., Monis, P., & Ryan, U. (2014). Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples. *International Journal for Parasitology*, 44(14), 1105–1113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.08.004>
114. Yeşilbağ, K., Alpay, G., & Becher, P. (2017). Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. *Viruses*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/v9060128>
115. Yue, X., Steeneveld, W., van der Voort, M., van Schaik, G., Vernooij, J. C. M., van Duijn, L., Veldhuis, A. M. B., & Hogeveen, H. (2021). The effect of bovine viral diarrhea virus introduction on milk production of Dutch dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 2074–2086. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18866>
116. Zhang, Y., Zhang, Z., Wang, Z., Wang, Z., Wang, C., Feng, C., Yuan, W., Lin, X., & Wu, S. (2019). Development of a droplet digital PCR assay for sensitive detection of porcine circovirus 3. *Molecular and Cellular Probes*, 43(October), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2018.11.005>
117. Zoccola, R., Mazzei, M., Carrozza, M. L., Ricci, E., Forzan, M., Pizzurro, F., Giammarioli, M., Bandecchi, P., & Tolari, F. (2017). A newly developed BVDV-1 RT-qPCR Taqman assay based on Italian isolates: evaluation as a diagnostic tool. *Folia Microbiologica*, 62(4), 279–286. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0497-8>

ANEXOS

Anexo 1. Detección y cuantificación del Virus de la Diarrea Viral Bovina mediante tres técnicas moleculares de diagnóstico: PCR convencional, *Real time* PCR y *Droplet Digital* PCR de muestras de suero bovino

Nº muestra	ARN ng/µl	260/280	PCR convencional	<i>Real time</i> PCR Ct	<i>Real time</i> PCR copias/µl	<i>Droplet Digital</i> PCR copias/µl
39	19	1.7	Positiva	20,14	497026,5	145
43	9,7	1.7	Positiva	22,44	88289,5	92,2
41	21,9	1.7	Positiva	21,55	183120	34,2
42	1	-4	Positiva	26,76	129.522	23,7
34	50,1	1.25	Positiva	25,66	86000,5	167
31	12,7	3.55	Positiva	24,47	21095,5	66,7
36	0,3	0.17	Positiva	25,41	9331	15,1
44	0,9	0.7	Positiva	24,1	25035	9,7
45	14,6	1.7	Positiva	22,73	36439	7,4
10	8	2.58	Positiva	35,13	<10	21,1
2	11,7	1.93	Positiva	31,5	104,5	6,7
32	10,5	1.04	Positiva	25,6	8090	8,4
33	20,6	1	Positiva	31,5	329	6,6
46	21,6	1.71	Positiva	24,72	15988	6
28	0,2	1.91	Positiva	27,23	2557	4
40	20,2	1,7	Positiva	25,91	6685	1,9
35	5	19.41	Positiva	33,33	33	1
5	9,6	1.99	Positiva	32,04	75,5	0,8
21	2,9	1.74	Positiva	30,93	165	0,7
23	2,1	3.05	Positiva	32,12	80,5	0,61
25	4,8	2.48	Positiva	32,67	71,5	0,52
17	12,8	1.85	Positiva	31,09	227	0,4
6	7,4	2.13	Positiva	34,7	<10	0,11
27	14,8	1,91	Negativa	32,12	64	0,14
29	17,5	2,44	Positiva	35,17	<10	0,31
9	8,1	1.96	Positiva	36,03	<10	0,23
30	17,6	3.82	Positiva	35,58	<10	0,2
24	15,4	1.8	Negativa	35,45	<10	0,4
20	15,5	1.74	Negativa	35,9	<10	0,25
15	13,2	1.81	Positiva	36,02	<10	0,4
1	12	1.97	Negativa	34,9	<10	0
3	14,5	1.86	Negativa	35,1	<10	0
4	8,9	2	Negativa	35,9	<10	0
7	6	1.85	Negativa	35,3	<10	0
8	4,3	1.85	Negativa	34,8	<10	0
11	12,6	2.25	Negativa	35,5	<10	0
12	5,1	2.25	Negativa	34,7	<10	0

13	7,2	2.41	Negativa	35,2	<10	0
14	7,2	2.29	Negativa	34,7	<10	0
16	28	2,31	Negativa	35,6	<10	0
18	6,9	2.7	Negativa	37,7	<10	0
19	12,8	7.06	Negativa	36,6	<10	0
22	3,6	2.35	Negativa	34,6	<10	0
26	6	2.08	Negativa	34,76	<10	0
37	55,2	1.77	Negativa	35,7	<10	0
38	59,8	1,81	Negativa	34,7	<10	0
