



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA EN
GANADO BOVINO DE NUESTRO PAÍS.

Dra. Kelly Guedes

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2018



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA EN
GANADO BOVINO DE NUESTRO PAÍS.

Dra. Kelly Guedes

Dra. Helena Guarino

Directora de tesis

Dra. Adriana Delfraro

Co-directora

2018

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS DE
MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

“Detección y caracterización molecular del virus de diarrea viral bovina en ganado bovino de nuestro país.”

Por: Dra. Kelly Guedes

Directora de tesis: Dra. Helena Guarino

Co-directora de tesis: Dra. Adriana Delfraro

Tribunal

Presidente:

Segundo miembro:

Tercer miembro:

Fallo del tribunal:

Lugar

Fecha

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

“Detección y caracterización molecular del virus de diarrea viral
bovina en ganado bovino de nuestro país”

Por: Dra. Kelly Rosario GUEDES ÁLVEZ.

Directora de Tesis: Dra. Helena Guarino

Codirectora de Tesis: Dra. Adriana Delfraro

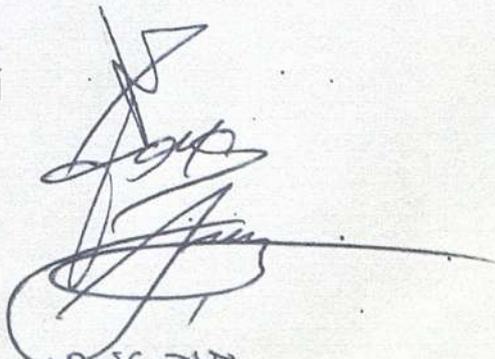
Tribunal

Presidente: Dra. Silvia Llambí

Segundo Miembro: Dr. Juan Arbiza

Tercer Miembro: Dr. Álvaro Núñez

Fallo del Tribunal: Aprobado con menciones



Salón de Posgrados
Viernes 13 de abril de 2018

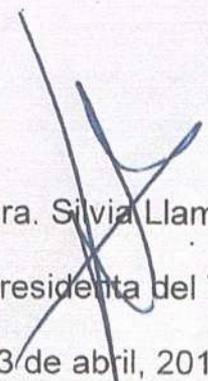
Montevideo, 13 de abril del 2018

La tesis de Maestría en salud animal presentada y defendida por Kelly Guedes, abarca el estudio de la detección y caracterización por técnicas moleculares del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) en una muestra de bovinos en Uruguay. Utilizan técnicas de ELISA y RT-PCR a partir de muestras de sueros de bovinos (novillos y vaquillonas) provenientes del banco del DILAVE para selección y caracterización viral. Mediante análisis de secuenciación realizan un estudio filogenético del vDVB.

La versión escrita de la tesis presenta una actualizada revisión de antecedentes. El planteamiento del objetivo general y objetivos específicos son adecuados, por otro lado la metodología utilizada permitió llegar a resultados esperados.

La presentación oral fue clara y las respuestas al tribunal han demostrado solvencia en el tema de tesis por parte de Kelly Guedes.

Por lo antedicho, el tribunal decide otorgar a la tesis presentada por Kelly Guedes la calificación aprobada con mención.



Dra. Silvia Llambí

Presidenta del Tribunal

13 de abril, 2018

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE	i
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
SUMMARY	vi
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Historia del virus	2
1.2 El género <i>Pestivirus</i>	3
1.3 Mecanismos involucrados en la diversidad genética	5
1.3.1 Mutaciones puntuales	5
1.3.2 Recombinación	6
1.4 Virus de la Diarrea Viral Bovina	6
1.4.1 Estructura	6
1.4.2 Características genómicas	7
1.4.3 Resistencia	8
1.4.4 Epidemiología	8
1.4.5 Clasificación de vDVB	8
1.4.6 Distribución mundial del virus DVB	9
1.4.7 Bases moleculares de los biotipos	9
1.4.8 Importancia epidemiológica y clínica de los biotipos	10
1.5 Diagnóstico	11
1.5.1 Detección de anticuerpos anti-DVB	12
1.5.2 Detección de las proteínas virales	12
1.5.3 Identificación del genoma viral	12
2 ANTECEDENTES	13
2.1 En nuestro país	13
2.2 Antecedentes de caracterización molecular en la región	14
2.2.1 Brasil:	14
2.2.2 Argentina:	14
2.2.3 Chile:	14
3 OBJETIVO GENERAL	15
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivos específicos	15

4	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	16
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1	Muestras y reactivos.....	17
5.2	Detección antigénica	17
5.3	Detección molecular	18
5.4	Extracción del ARN viral.....	18
5.5	RT-PCR.....	18
5.5.1	RT-PCR detección vDVB tipo 1 y 2	18
5.5.2	Reconstitución de los cebadores.....	19
5.5.3	Mix de reacción	19
5.6	RT-PCR virus tipo Ho-Bi.....	20
5.6.1	Reconstitución de los cebadores.....	21
5.6.2	Mix de reacción	21
5.7	Electroforesis.....	22
5.8	Purificación de los amplicones	22
5.9	Cuantificación del ADN purificado	22
5.10	Secuenciación	23
5.11	Análisis filogenético	23
6	RESULTADOS	25
6.1	Resultados serológicos	25
6.2	Resultados moleculares	26
6.3	Resultados del análisis <i>in silico</i>	28
7	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	34
7.1	Comparación entre los ensayos ELISA	34
7.2	Comparación entre ensayo ELISA y RT-PCR.....	34
7.3	Diversidad de los <i>Pestivirus</i>	34
7.4	Genotipificación.....	35
7.5	Conclusiones finales.....	37
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
9	ANEXO.....	50
9.1	ANEXO I: TAXONOMÍA PROPUESTA PARA LOS <i>Pestivirus</i>	50
9.2	ANEXO II: LISTA DE REACTIVOS UTILIZADOS	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro I. Descripción de los oligonucleótidos para la detección de vDVB -1 y vDVB -2. ...	18
Cuadro II. Protocolo nº1: ciclos de RT- PCR para la detección de vDVB -1 y vDVB -2	19
Cuadro III. Protocolo nº2: ciclado de RT-PCR para la detección de vDVB -1 y vDVB -2. ...	20
Cuadro IV: Descripción de los cebadores para la detección de los virus tipo Ho-Bi.....	21
Cuadro V. Protocolo nº3: ciclado de RT- PCR para la detección virus tipo Ho-Bi.	21
Cuadro VI. Secuencias incluidas en nuestro estudio obtenidas del GenBank.....	24
Cuadro VII. Cálculo de la distancia p para las cepas caracterizadas como 1i en relación a las cepas de referencia y las cepas uruguayas antes reportadas.	30
Cuadro VIII. Caracterización de las cepas estudiadas y su número de acceso al GenBank.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia propuesta para el género Pestivirus basado en la región 5'UTR.	4
Figura 2. Esquema de la generación de cuasiespecies en virus ARN.	5
Figura 3. Microfotografía electrónica del virus de diarrea viral bovina.	7
Figura 4. Genotipificación de las especies del virus DVB.....	7
Figura 5. Esquema del genoma viral.	8
Figura 6. Esquema de la estructura secundaria de la región 5'UTR.	9
Figura 7. Esquema de la generación de cepas citopáticas de vDVB por recombinación heteróloga.	10
Figura 8. Esquema del mecanismo de generación de la enfermedad de las mucosas.	11
Figura 9. Distribución mundial actual de los virus tipo Ho-Bi.	15
Figura 10. Ensayo de ELISA antígeno de captura para virus DVB.....	26
Figura 11. Gel de electroforesis del ensayo de RT-PCR para vDVB-1 y vDVB-2.....	27
.....2827	
Figura 12. Gel de electroforesis del ensayo de RT-PCR para los virus tipo Ho-Bi.	28
Figura 13. Árbol filogenético basado en la región 5'UTR.	34

RESUMEN

El virus de diarrea viral bovina (vDVB) es responsable de diversos problemas productivos y reproductivos en el ganado bovino, lo que lleva a grandes pérdidas económicas en el mundo. El virus está clasificado en la familia *Flaviviridae*, género *Pestivirus*, presentando dos especies vDVB-1 y vDVB-2 y una enorme diversidad genética asociada a los mecanismos de mutación y recombinación. En el año 2004 se identificó en suero fetal bovino, proveniente de Brasil, un nuevo virus (cepa D32/00_HoBi) que luego fue propuesto como genotipo 3 de vDVB. Para este estudio se procesaron 153 muestras de suero sanguíneo (n=153) pertenecientes a novillos y vaquillonas para carne y leche positivas a vDVB por la prueba de Elisa Antígeno. Los sueros fueron obtenidos del Banco de Sueros de la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE), del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. De ellos se utilizaron los que resultaron fuertemente positivos (n=60) para la detección molecular. Para la amplificación genómica se utilizaron dos pares de cebadores que hibridan en la región 5' UTR: 324- 326 para la detección de los vDVB-1 y vDVB-2 y N2- R5 específico para la detección de los virus tipo Ho-Bi. Se obtuvieron 42 secuencias de buena calidad para el análisis filogenético, de las cuales 40 cepas (95,2 %) se agruparon como vDVB-1 y las otras dos como vDVB-2 (4,8 %). Dentro del vDVB-1, 36 cepas (90 %) se caracterizaron como subtipo 1a (aLRT=0,90) y las otras 4 (10 %) corresponden al subtipo 1i (aLRT=0,82 y aLRT=0,77). Dentro del vDVB-2, las dos secuencias agruparon en el subtipo 2b (aLRT=0,99). Se concluye que el vDVB-1 presenta mayor distribución en el país, en particular el subtipo 1a. Se detectaron cepas del subtipo 1i las que hasta el momento solo han sido descritas para América en Brasil y Uruguay. No se detectó la circulación de los virus tipo Ho-Bi. A futuro sería necesario ampliar la región a secuenciar con el fin de obtener mayor número de sitios informativos y mejorar la resolución de la filogenia y por ende la precisión de la genotipificación. El presente estudio, por el número elevado de muestras analizadas, los resultados obtenidos y su relación con las cepas de la región, constituye un aporte significativo al conocimiento de las cepas circulantes en el ganado bovino de nuestro país y a los estudios de epidemiología molecular de la infección por el virus DVB.

SUMMARY

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is responsible for numerous productive and reproductive disorders in cattle that lead to major economic losses in the world. The virus is classified within *Flaviviridae* family in the genus *Pestivirus* with two species: BVDV-1 and BVDV-2, and a great genetic diversity associated with mutation and recombination mechanisms. In 2004, a new virus (strain D32/00_HoBi) was identified in bovine fetal serum from Brazil, and proposed as BVDV-3. One hundred and fifty three (n= 153) blood serum samples from steers and heifers of meat and milk purpose, positives by ELISA Ag test were analyzed. The sera were obtained from the serum bank of the Division of Veterinary Laboratories (DILAVE), Ministry of Agriculture and Fisheries. Of them, the strongly positive ones were analyzed for molecular detection (n = 60). For genomic amplification, two pairs of primers hybridizing in the 5' UTR region were used: 324-326 for the detection of BVDV-1 and BVDV-2 and N2-R5 specific for the detection of Ho-Bi type viruses. Forty-two sequences of good quality were obtained for phylogenetic analysis, of which 40 strains (95.2%) were grouped into BVDV-1 and the other two into BVDV-2 (4.8%). Within BVDV-1, 36 strains (90%) were characterized as subtype 1a (to LRT = 0.90) and 4 (10%) corresponded to subtype 1i (to LRT = 0.82 and to LRT = 0.77). Within BVDV-2, both sequences grouped in subtype 2b (to LRT = 0.99). It is concluded that BVDV-1 has greater distribution in the country, in particular subtype 1a. Strains of subtype 1i were detected which, until now, have only been described for America in Brazil and Uruguay. No circulation of Ho-Bi type viruses was detected. It would be necessary to expand the region to be sequenced in order to have a greater number of information sites and to improve the resolution of phylogeny analyses and therefore the precision of genotyping. Considering the high number of samples analyzed, the results obtained and their relationship with the strains of the region, this study constitutes a significant contribution to the knowledge of the circulating strains in the cattle of our country and to the molecular epidemiology studies of the DVB infection.

1 INTRODUCCIÓN

El virus de la diarrea viral bovina (vDVB) presenta distribución mundial, siendo la causa de una de las infecciones más importantes del ganado bovino. Esto se debe a su alta prevalencia y las cuantiosas pérdidas económicas que genera asociado a trastornos productivos y reproductivos (Houe, 1999; Houe, 2003). Dentro de estos últimos los signos más relevantes son repetición de celos, abortos, momificación, anomalías congénitas, mortinatos. Además, puede provocar mortalidad neonatal, cuadro respiratorio y/o entérico, caída del rendimiento productivo, sumado a la eliminación precoz de animales y ocasionalmente mortalidad en animales adultos (Liebler-Tenorio, 2005).

En nuestro país que es básicamente ganadero es fundamental mantener la sanidad de los rodeos. Según el último informe del MGAP-DIEA (2016) el total de cabezas bovinas es de 12 millones (www.mgap.gub.uy). Un factor muy importante que atenta contra la eficacia del sistema productivo son las enfermedades reproductivas. Entre ellas, la diarrea viral bovina, es una de las patologías infecciosas más importantes, encontrándose ampliamente distribuida en nuestros rodeos (Saizar & Gil, 1998; Mederos & Hirigoyen, 1998; Repiso et al. 2005) siendo descrita como una de las principales causas de aborto de etiología viral (Repiso et al. 2005; Easton, 2006). Los estudios moleculares reportados previamente no abarcaron un número significativo de muestras (Guarino et al. 2000; Maya et al. 2015), si bien demostraron la presencia de ambas especies del virus (vDVB tipo 1 y vDVB tipo 2) y de algunos subtipos. En los últimos años se han detectado numerosas cepas de un pestivirus atípico bovino, también denominado virus tipo Ho-Bi, en diversos países de todos los continentes, lo que alerta sobre la emergencia de estos virus, que algunos investigadores denominan como vDVB-3 (Schirrmeier et al. 2004; Liu et al. 2009; Bauermann & Ridpath, 2015). Estos han sido descritos como los *Pestivirus* de mayor prevalencia en el Noroeste de Brasil (Silveira et al. 2017) y se ha reportado la circulación en Argentina en búfalos de agua (Pecora et al. 2017). Dado que resultan clínicamente indistinguibles de los cuadros causados por vDVB1 y vDVB-2, y poseen baja reactividad cruzada entre ellos, representan un nuevo desafío en el conocimiento de la epidemiología de la infección y fundamentalmente en el diagnóstico y medidas de control efectivas (Bauermann et al. 2013b; Bauermann et al. 2016).

Este trabajo pretende analizar y caracterizar un número mayor de cepas circulantes del virus en nuestros rodeos, con la intención de aportar más información a nivel genómico y monitorear la posible circulación de los *Pestivirus* bovinos emergentes presentes en la región. Por otra parte, se espera generar una base de datos con los datos obtenidos lo que permitirá continuar profundizando en futuros estudios de epidemiología molecular en el país.

1.1 Historia del virus

El virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) fue reconocido por primera vez en América del Norte (Estados Unidos y Canadá) asociado a brotes de enfermedad aguda con baja mortalidad y caracterizado por: fiebre, depresión, anorexia, leucopenia, diarrea intensa y lesiones eruptivas en el tracto gastrointestinal (Olafson et al. 1946; Childs, 1946). Luego se reportó una enfermedad similar, pero con sintomatología más severa, con rápida deshidratación y pérdida de estado, erosiones y úlceras a lo largo del tracto gastrointestinal, diarrea violenta continua o intermitente sumado a lesiones en el endotelio vascular de altísima mortalidad, que afectaba unos pocos animales, denominada finalmente enfermedad de las mucosas (Ramsey & Chivers, 1957). Mediante la propagación del virus en cultivos celulares, se observó que podían dividirse en: cepas citopáticas (cp) y no citopáticas (ncp), de acuerdo a su habilidad de generar cambios citopatogénicos (Lee & Gillespie, 1957; Gillespie et al. 1960).

Ya en 1961, Coggins et al. lograron modificar una cepa de campo con el propósito de controlar la enfermedad por medio de la vacunación, a partir de ahí, se han desarrollado tanto vacunas atenuadas como inactivadas.

En la década del noventa, a partir de la ocurrencia de brotes asociados a cepas más virulentas con mayor índice de mortalidad, y empleando el análisis genómico, se establecieron dos genotipos del virus: 1 (vDVB-1) y 2 (vDVB-2) (Pellerin et al. 1994). Ello obligó a rever las pruebas diagnósticas, así como las medidas de profilaxis y control, principalmente las vacunas disponibles, luego que se demostrara que existe baja reactividad cruzada entre ambos genotipos (Bolin & Ridpath, 1996).

Mientras la infección por el vDVB-1 se encuentra distribuida en todo el mundo, el vDVB-2 se ha aislado en todos los continentes excepto Australia (Ridpath, 2010). En Suiza, Schirrneier et al. (2004) identificaron un nuevo virus (D32/00_HoBi) en suero fetal bovino proveniente de Brasil, sugiriendo que se trataría de una nueva especie de *Pestivirus*. Desde entonces, se han identificado numerosas cepas emparentadas filogenéticamente con él, conformando un grupo denominado virus tipo “Ho-Bi” o “Pestivirus atípico bovino”. Las cepas identificadas en diversas regiones del mundo han sido descritas contaminado suero fetal (Stalder et al. 2005; Liu et al. 2009a; Xia et al. 2011, 2013; Peletto et al. 2012; Mao et al. 2012; Bauermann et al. 2013b; Gao et al. 2016) y en muestras de fetos abortados (Cortez et al. 2006; Decaro et al. 2012). Al mismo tiempo se aislaron en infecciones naturales de bovinos en: Italia, Tailandia, Bangladesh, India y Brasil (Ståhl et al. 2007; Bianchi et al. 2011; Liu et al. 2012; Decaro et al. 2011; Haider et al. 2014; Mishra et al. 2014; Cortez et al. 2017). Así como también, en animales con infección persistente natural o experimental (Decaro et al. 2013; Bauermann et al. 2014a, Silveira et al. 2015) y asociado a la enfermedad de las mucosas (Decaro et al. 2014; Weber et al. 2014a). Basado en estudios antigénicos y moleculares, Liu et al. (2009b), propusieron que

se trataría de cepas de vDVB-3. Actualmente, el análisis filogenético de este grupo de virus los clasifica en 4 subtipos: a, b, c, d; los dos últimos solo reportados en India (Mishra et al. 2014; Giammarioli et al. 2015).

Estudios in vitro han demostrado que existe una baja reacción cruzada entre las cepas vDVB-1, vDVB-2 y los virus tipo Ho-Bi, por lo cual, las vacunas actuales no serían efectivas para el control de la enfermedad en una infección natural causada por los últimos (Bauermann et al. 2013b; Bauermann et al. 2016). A pesar de que su distribución es restringida aún, son virus emergentes cuya introducción en nuevas regiones pone en alerta los programas de control existentes (Bauermann & Ridpath, 2015).

1.2 El género *Pestivirus*

El vDVB se encuentra relacionado antigénicamente con el virus de la peste porcina clásica (CSFV, sigla del inglés) y el virus de la enfermedad de la frontera (BDV, sigla del inglés), por lo cual, fueron agrupados con el término *Pestivirus* en 1973, siendo clasificados como un género dentro de la familia *Togaviridae* (Fenner, 1976). A partir de la primera secuenciación completa del genoma de un *Pestivirus*: la cepa NADL del virus DVB, dicha clasificación fue revisada y el género incluido en la familia *Flaviviridae* (Francki et al. 1991). Luego se establecieron dos genotipos del virus: 1 (vDVB-1) y 2 (vDVB-2) teniendo en cuenta al hospedero de origen, la presentación clínica y el análisis molecular de la región 5' UTR (Pellerin et al. 1994; Ridpath et al. 1994). Más tarde, estos fueron aceptados como especies diferentes dentro del género (Thiel et al. 2005). Actualmente están son las únicas cuatro especies reconocidas dentro del género por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) en su último reporte del 2017 (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>).

Numerosos aislamientos han sido propuestos como posibles nuevas especies de *Pestivirus*, tanto de animales domésticos como salvajes: virus giraffe -1, aislado de jirafas en Kenia (Plowright, 1969 en Avalos- Ramirez et al. 2001); virus pronghorn, identificado en un antílope en Estados Unidos (Vilcek et al. 2005); el grupo de virus "tipo Ho-Bi" aislados en sueros y en animales enfermos (Schirrmeyer et al. 2004); virus Bungowannah, descrito en cerdos en Australia (Kirkland et al. 2007). Más recientemente e identificados por metagenómica utilizando la tecnología de next- generation sequencing: virus "tipo -Aydin" aislado en pequeños rumiantes en Turquía (Oguzoglu et al. 2009); pestivirus detectado en murciélagos en China (Wu et al. 2012); pestivirus reportado en ratas en Estados Unidos (Firth et al. 2014); pestivirus porcino atípico descrito en Estados Unidos (Hause et al. 2015) y el virus LINDA aislado en cerdos en Austria (Lamp et al. 2017). Hasta el momento ninguno de estos virus ha sido reconocido como una nueva especie por el ICTV. En la figura 1 se esquematiza la filogenia propuesta para clasificar al género *Pestivirus* según Mósena et al. (2017a).

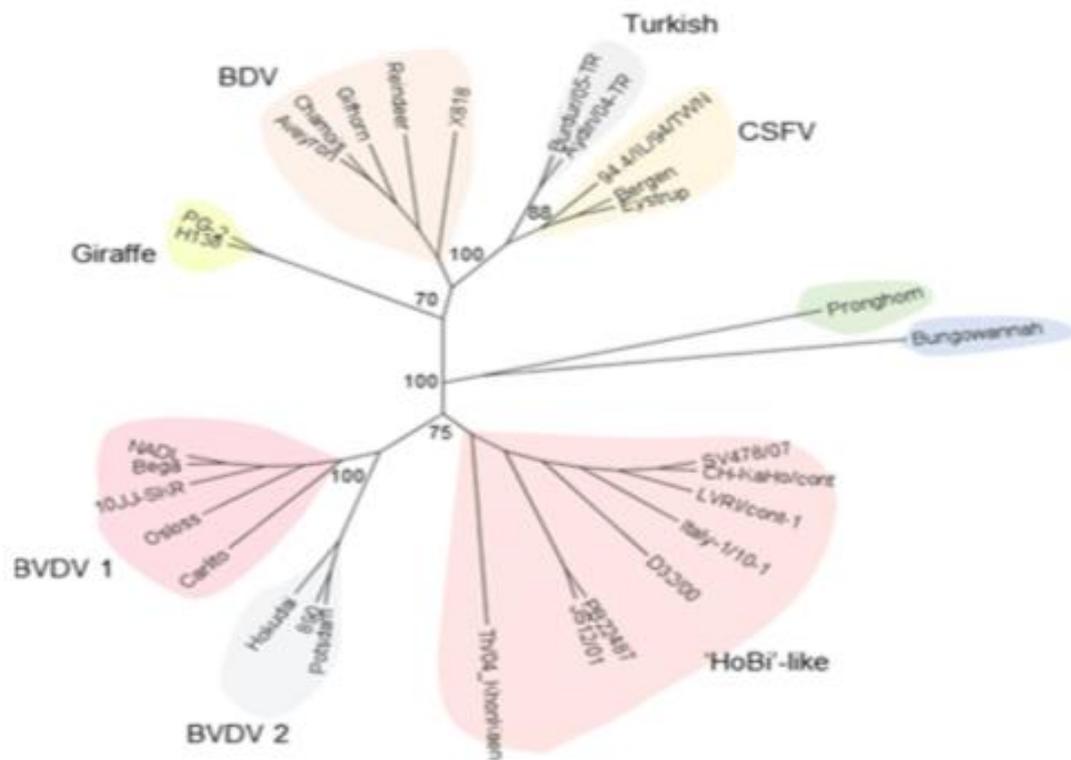


Figura 1. Filogenia propuesta para el género *Pestivirus* basado en la región 5'UTR. Fuente: Mósena et al. 2017a.

Para el ICTV los criterios que rigen actualmente para determinar que un virus es una especie dentro del género *Pestivirus* son: divergencia de más del 25 % entre las secuencias nucleotídicas, desplegar una diferencia > 10 veces en los títulos de neutralización cruzada y tal vez presentar variaciones en el rango de hospederos afectados. Smith et al. (2017) pertenecen al grupo de estudio de los *Pestivirus* del ICTV y han propuesto una nueva clasificación taxonómica. Todo ello debido a la creciente diversidad de especies tentativas que se han descrito y teniendo en cuenta que el género no ha tenido cambios desde 1999. En base al análisis de las divergencias genéticas tanto aminoacídicas como nucleotídicas, y en algunos casos, a las relaciones antigénicas es que los autores incluyen otras 7 especies dentro del género. Menos claro es el rango de hospedadores que pueden ser infectados por estos virus, de los cuales, en muchos casos, se conoce poco de su biología. Se propone un nuevo sistema uniforme de denominación con el formato *Pestivirus* "X", donde "X" representa diferentes letras capitales para cada género. El anexo I muestra la taxonomía propuesta (Smith et al. 2017).

1.3 Mecanismos involucrados en la diversidad genética

1.3.1 Mutaciones puntuales

Una característica de los virus ARN es su alta tasa de mutación, en especial, los ARN de cadena positiva, como las especies del género *Pestivirus*, pueden sufrir mutaciones puntuales, así como recombinación.

Luzzago et al. (2012) determinaron una tasa de sustitución nucleotídica de 9.3×10^{-3} sustitución/sitio/año para la región 5'UTR de las cepas estudiadas del vDVB, por lo tanto, en cada ciclo de replicación viral cabría esperar un evento mutacional. De esta forma se crea una población de virus mutantes que han sido llamadas: cuasiespecies (figura 2). A pesar de que muchas de esas mutaciones no se sostienen evolutivamente ya que son deletéreas para la supervivencia del virus, la habilidad de generar mutantes que se adaptan rápidamente a la respuesta del hospedador es una de las fuerzas que provoca la aparición de las infecciones persistentes característica de los *Pestivirus* (Bolin & Grooms, 2004; Hammers et al. 2001). Es decir, la multiplicidad de variantes presentes en esa cuasiespecie es lo que le da la capacidad adaptativa ante las presiones del ambiente.

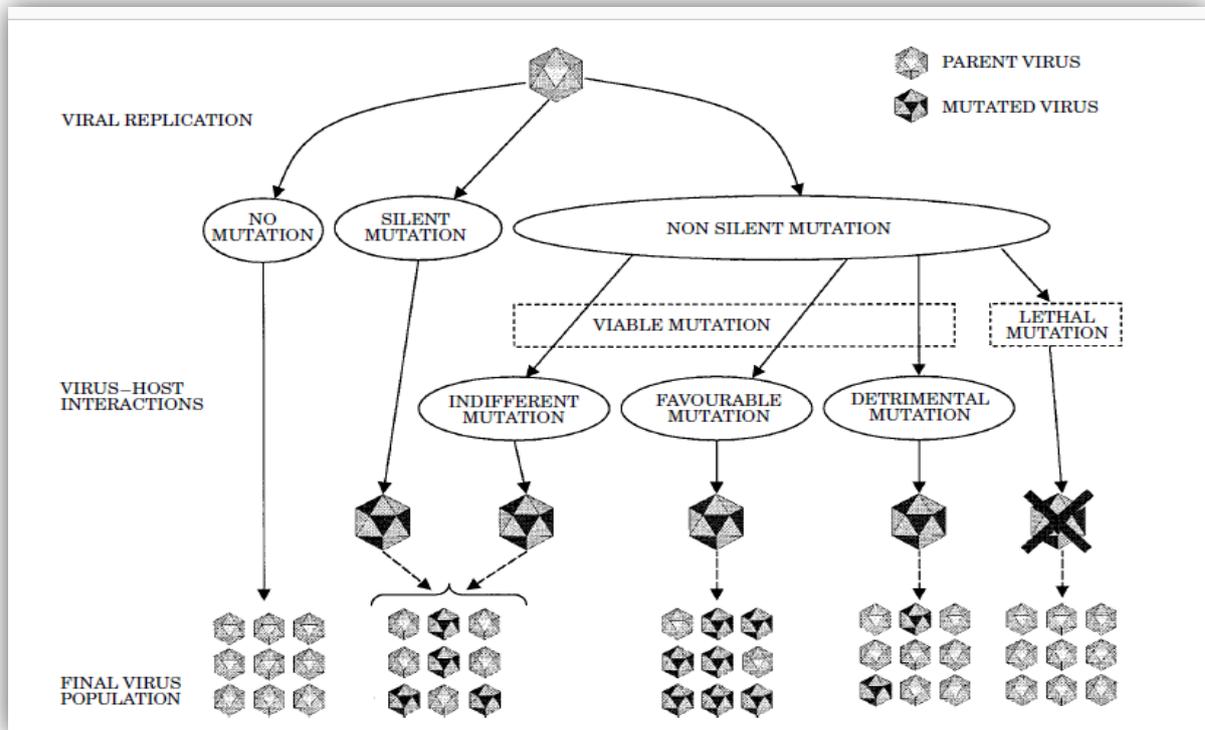


Figura 2. Esquema de la generación de cuasiespecies en virus ARN. Fuente: Hammers et al. 2001.

1.3.2 Recombinación

Este es un mecanismo de evolución natural bien conocido en los virus ARN. Este proceso ocurre cuando una secuencia donante es introducida en una secuencia receptora contigua generándose un híbrido que contiene información genética de ambos. Si dicho evento se da entre secuencias no relacionadas se conoce como: recombinación no- homóloga u heteróloga, de lo contrario, se denomina: homóloga.

1.3.2.1 Recombinación homóloga:

Para que este evento ocurra es necesario que exista coinfección con otras cepas del vDVB provenientes del exterior ya sea ambiental o por el uso de vacunas vivas atenuadas que reversionan a la virulencia causando una infección paralela (Kovago et al. 2016).

Este tipo de recombinación ha sido sugerido en vDVB-1 entre diferentes subtipos (Jones & Weber, 2004) y relacionada al segmento final de 5' UTR (5'UTR, Npro) (Becher et al. 1999). Así como, en ambas especies, a partir de cadenas de diferentes subtipos (Weber et al. 2015). Previamente, se había reportado un recombinante entre ambas especies del virus, una cepa ncp vacunal del genotipo 1 y otra cepa ncp del genotipo 2 producto de una infección natural (Ridpath & Bolin, 1995). Recientemente, un estudio sobre la evolución de vDVB-1 confirmó que la recombinación homóloga no es un evento raro y que puede ocurrir entre los mismos o diferentes subtipos. Estos autores sostienen que los eventos de recombinación asociados a la región final de 5'UTR (5'UTR, Npro) no están bien sustentados cuando se estudia el genoma completo (Kovago et al. 2016).

1.3.2.2 Recombinación heteróloga:

Ha sido descrita para otros Pestivirus y es el mecanismo más eficaz que conduce a la generación de las cepas citopáticas del vDVB (Yesilbag et al. 2017).

1.4 **Virus de la Diarrea Viral Bovina**

1.4.1 Estructura

EL vDVB posee genoma ARN de cadena simple y polaridad positiva de aproximadamente 12,3 Kb de longitud. Las partículas virales tienen apariencia esférica, de 40 a 60 nanómetros de diámetro y contienen un core electrodensito rodeado de una bicapa lipídica (figura 3). Esta envoltura deriva de la membrana celular de la célula huésped (Lindenbach & Rice, 2007).

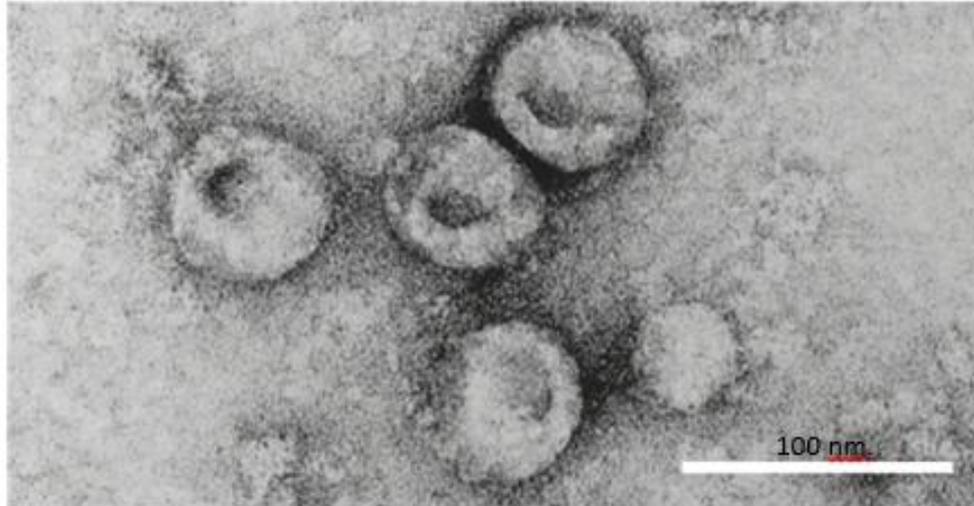
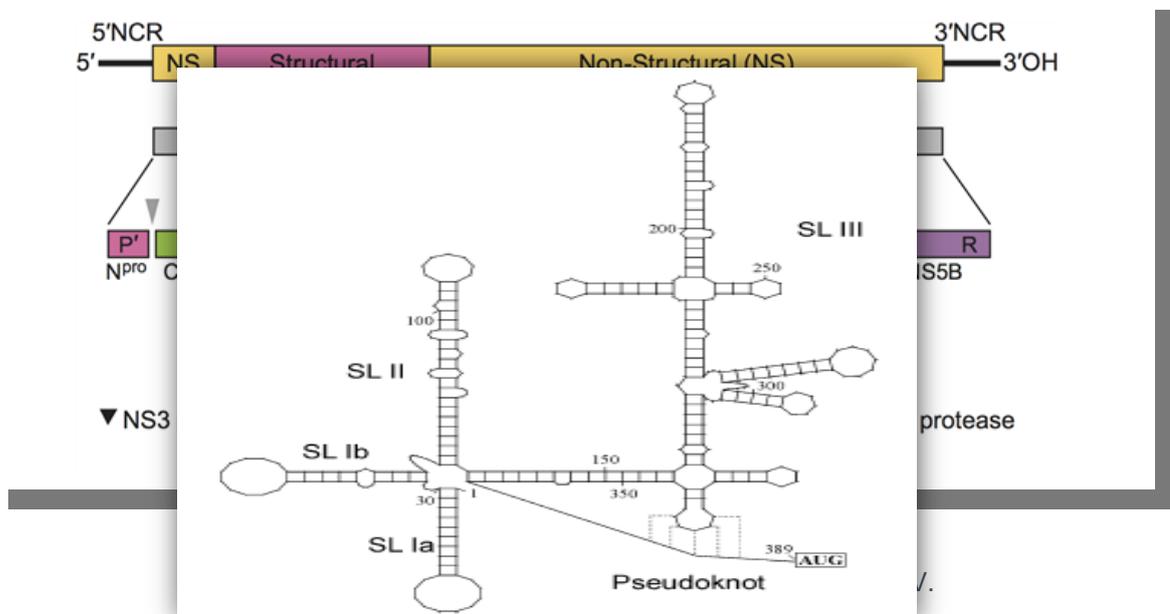


Figura 3. Microfotografía electrónica del virus de diarrea viral bovina. Fuente: ICTV.

1.4.2 Características genómicas

El genoma del virus (figura 4) puede dividirse en tres regiones: una zona central codificante que contiene un único marco de lectura abierto (ORF) flanqueada por dos regiones no codificantes 5' y 3' (UTRs). El ORF posee 3988 codones que codifican una proteína de 449 kDa. En la molécula parecen faltar las dos típicas estructuras del ARNm eucariota: 5' cap y 3' poly A, esta es sustituida por un breve tracto de poli C (Collett et al. 1988a; Brock et al. 1992). Es decir, que el inicio de la traducción es cap independiente y ocurre a partir de una secuencia interna de iniciación en el sitio de entrada ribosomal (IRES) en la región 5'. Esta posee 385 nucleótidos y es altamente conservada lo que se relaciona con la presencia de estructuras terciarias (figura 4) necesarias para actuar como IRES (Deng & Brock, 1993; Pestova & Hellen, 1999). El ORF se traduce en una poliproteína que es procesada por proteasas virales y celulares. Comienza con una N- proteasa terminal (N-pro) seguida por los genes que codifican las proteínas estructurales: proteína de la cápside (C) y proteínas de la envoltura (E0, E1, E2). El extremo terminal está ocupado por las proteínas no estructurales (NS): p7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (Donis, 1995).



1.4.3 Resistencia

Debido a su envoltura el virus puede ser inactivado rápidamente por detergentes y solventes orgánicos como éter y cloroformo (Hermodsson & Dinter, 1962). Los viriones toleran un rango de pH de 5,7 a 9,3 (Hafez & Liess, 1972). Resisten el congelamiento, pero su infectividad decrece a temperaturas por encima de los 40° C (Heinz et al. 2000). Puede ser inactivado durante el tratamiento con tripsina (0.5 mg/mL a 37° C por 60 m) (Liess, 1990) y radiaciones gamma (20-30 kGy) (Miekka et al. 1998).

1.4.4 Epidemiología

El virus no es específico de especie, si bien primeramente fue aislado en bovinos, luego fue detectado en otras especies domésticas como cerdos y un amplio rango de hospederos rumiantes: ovinos, cabras, ciervos, búfalo, jabalí, alpaca, llamas, camellos, yak y bongos. La transmisión ocurre fundamentalmente a través del contacto con secreciones y excreciones infectadas (Smith et al. 2017; Yesilbag et al. 2017; Simmonds et al. 2017).

1.4.5 Clasificación de vDVB

El análisis filogenético del vDVB-1 demostró que puede dividirse en al menos 21 subtipos: vDVB - 1a al vDVB – 1u (Vilcek et al. 2001; Vilcek et al. 2004; Jackova et al. 2008; Kadir et al. 2008; Nagai et al 2008; Xue et al. 2010; Gao et al. 2013; Yesilbag et al. 2014; Deng et al. 2015). A su vez, el vDVB-2 puede clasificarse en 3 subtipos: 2a, 2b y 2c (Flores et al. 2002; Vilcek et al. 2004; Jenckel et al. 2014; Peterhans et al. 2010; Silveira et al. 2015). Sin embargo, la genotipificación del virus a partir del análisis de la estructura secundaria de la región 5'UTR (PNS: Palindromic Nucleotide Substitutions) ha demostrado que el vDVB-2 podría dividirse por lo menos en cuatro subtipos: a, b, c y d (Giangaspero et al. 2008). Fueron reportados una serie de aislados que no han podido ser clasificados dentro de ninguno de los subtipos descritos (Yesilbag et al. 2017). La figura 4 muestra la gran diversidad genética del virus.

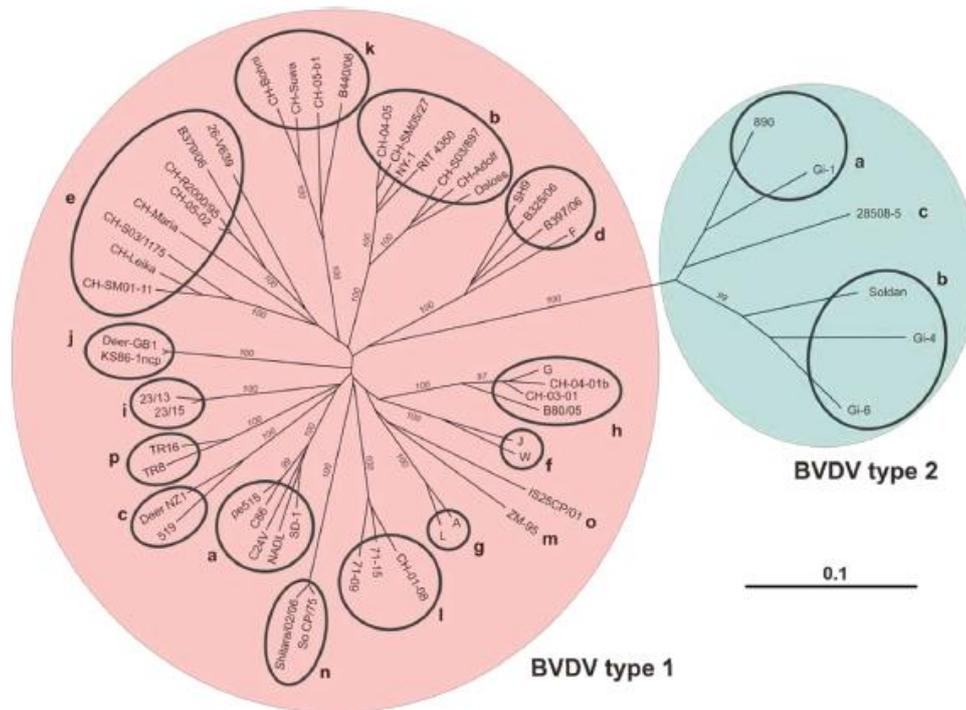


Figura 6. Genotipificación de las especies del virus DVB. Fuente: Peterhans et al. 2010.

1.4.6 Distribución mundial del virus DVB

En una recopilación de los aislamientos reportados para vDVB en los diferentes continentes, Yesilbag et al (2017) confirmaron que el subtipo 1b es el predominante en el mundo, seguido por el 1a y luego 1c. Considerando cada continente por separado: 1b es el más frecuente en América, Asia y Europa, mientras que en Australia es el 1c. En África los datos no son representativos de todo el continente, pero sugieren que al menos en Sudáfrica el subtipo 1a sería el más frecuente. También se desprende que los subtipos: 1m, 1n, 1o, 1p y 1q solo han sido reportados en Asia y los subtipos: 1f, 1g, 1h, 1k, 1l, 1r, 1s y 1t solo se han descrito en Europa. En todo el mundo dentro del DVB tipo 2 predomina el subtipo 2a.

1.4.7 Bases moleculares de los biotipos

El vDVB también se clasifica, como se mencionó anteriormente, en dos biotipos de acuerdo a su comportamiento en cultivos celulares. Las bases moleculares involucradas en la generación de los biotipos fueron dilucidadas siendo la mutación el primer mecanismo demostrado. En el biotipo ncp se observó que un evento mutacional resultaba en el procesamiento de la proteína NS2/3 (p125) en NS2 (p54) y NS3 (p80). La observación del efecto citopático fue correlacionada con la presencia de la proteína NS3, a veces, también de la proteína NS2 (Donis & Dubovi, 1987; Collett et al. 1988b). El segundo mecanismo que ha

sido descrito es la recombinación heteróloga, dónde, cortas secuencias del genoma de la célula infectada se insertan en el genoma viral. En la figura 7 se esquematiza la adquisición del gen de la ubiquitina (Meyers et al. 1991; Meyers et al. 1992; Kummerer et al. 2000). El tercer mecanismo que estaría involucrado es la recombinación homóloga, como fue sugerido por Ridpath & Bolin (1995).

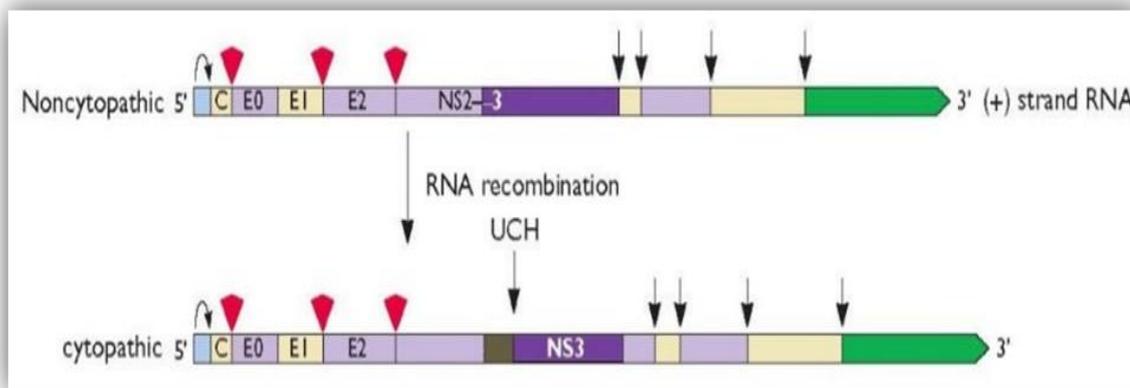


Figura 7. Esquema de la generación de cepas citopáticas de vDVB por recombinación heteróloga. Fuente: Meyers et al. 1991.

1.4.8 Importancia epidemiológica y clínica de los biotipos

Ambas especies del virus presentan los dos biotipos. El biotipo ncp es el más frecuente en los rodeos del mundo (Moennig & Plagemann, 1992; Ridpath, 2010) y está asociado con las formas clínicas agudas más severas (caracterizadas como vDVB- 2) y con la infección transplacentaria (Corapi et al. 1990; Pellerin et al. 1994; Carman et al. 1998; Ridpath et al. 2006). El biotipo cp se encuentra más o menos restringido al tracto digestivo (Bielefeldt-Ohmann, 1988).

Cuando una hembra preñada adquiere la infección, desde los 45 días (final del periodo embrionario) y hasta los 125 de gestación, debido a que el feto no tiene su sistema inmunológico desarrollado, adquiere el virus como propio, por lo que se vuelve inmunotolerante a él. Estos animales no generan anticuerpos neutralizantes, naciendo con viremia persistente y excretando el virus durante toda su vida (Brownlie et al. 1987; Dubovi, 1994).

Aunque ambos biotipos pueden atravesar la placenta solo las cepas ncp es capaz de generar y mantener una infección persistente (Brownlie et al. 1989; Peterhans et al. 2003). El mecanismo por el cual el virus evade al sistema inmune y genera estos animales

persistentemente infectados (P.I) está asociado a la incapacidad de las cepas ncp de inducir una respuesta de IFN- α en el feto (Charleston et al. 2001). Estos animales son los que mantienen endémica la infección y representan el 0.5 al 2 % de los rodeos del mundo (Houe, 1999). Puede ocurrir que ese animal P.I se sobreinfecte, en su vida temprana, con una cepa citopática y desarrolle la enfermedad de las mucosas cuyo desenlace es fatal (figura 8). Esa sobreinfección con otra cepa genéticamente diferente de la que causa la infección persistente, es posible y aparentemente no es un evento raro (Brownlie et al. 1984; Kovago et al. 2016). También puede generarse debido a cambios genéticos en la cnp que derivan en cp en el animal, por los mecanismos antes descritos (Donis & Dubovi, 1987; Collett et al. 1988b; Meyers et al. 1991; Meyers et al. 1992; Kummerer et al. 2000; Ridpath & Bolin, 1995).

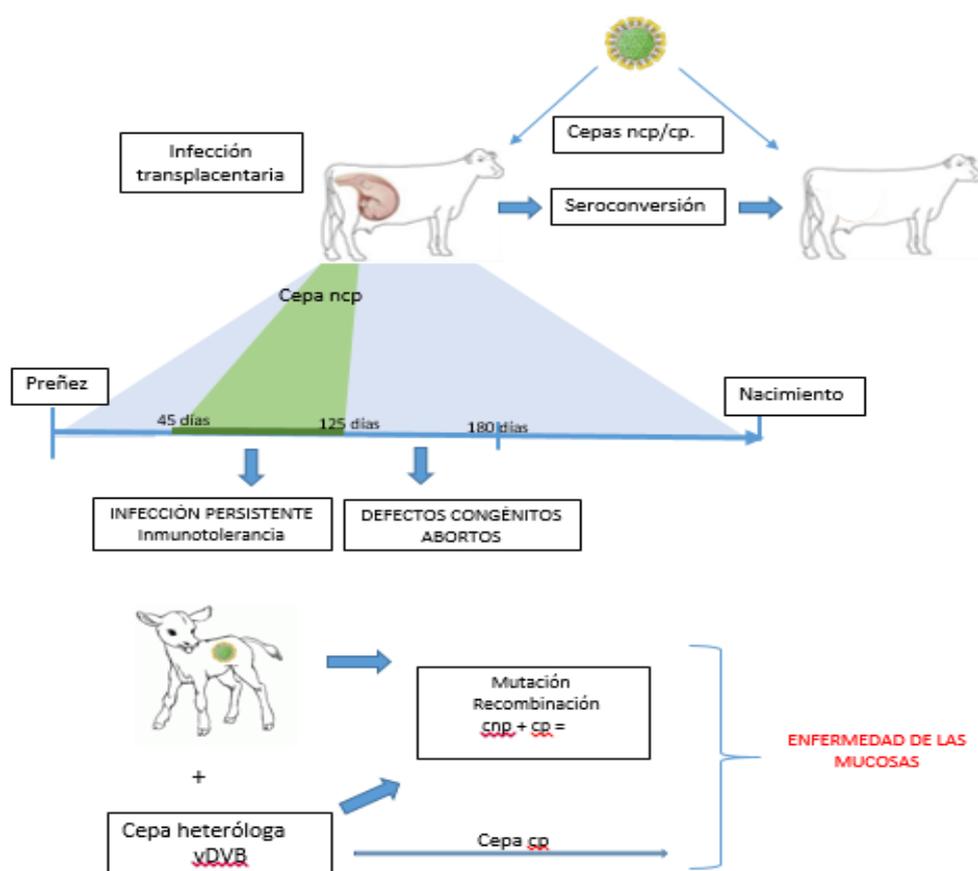


Figura 8. Esquema del mecanismo de generación de la enfermedad de las mucosas.

1.5 Diagnóstico

1.5.1 Detección de anticuerpos anti-DVB

Los anticuerpos pueden ser detectados en suero sanguíneo por ensayos validados por la OIE como prueba de neutralización, ELISA indirecto o de competición; habiendo kits comerciales disponibles.

Es sabido que la seroconversión ocurre a las 2 a 3 semanas post infección, llegando a un *plateau* 10 a 12 semanas después y perdurando toda la vida (Howard et al. 1992), por lo que la detección de anticuerpos en una sola muestra no es indicativa de infección reciente. La infección aguda se confirma demostrando la seroconversión mediante el uso de muestras pareadas secuenciales de varios animales en el grupo, con un mínimo de 21 días entre ellas (etapa clínica y convalescente) y posterior procesamiento en paralelo. (www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/2017).

Los animales P.I, durante la etapa fetal, aceptaron como propio al virus, no generando anticuerpos neutralizantes contra él (Brownlie et al. 1987).

1.5.2 Detección de las proteínas virales

La infección natural genera una viremia detectable hasta 7 días pos infección, mientras que, un animal PI la mantiene durante toda su vida (Brownlie et al. 1987). En ambos casos, es posible identificar el virus en sangre periférica del animal infectado (Goyal, 2005). Es por ello que la Organización Mundial de Sanidad Animal estipula, como una de las pruebas de referencia para el comercio internacional, la identificación del virus con el test ELISA antígeno. La prueba es robusta y altamente reproducible frente al aislamiento viral pero no determina si el virus es infeccioso o no (Ridpath, 2010). La prueba es menos sensible en animales menores de 6 meses pueden tener anticuerpos calostrales que interfieran en el diagnóstico. El más utilizado es el ELISA de captura o sándwich, con un anticuerpo de captura ligado a la fase sólida, y un detector de anticuerpo conjugado a un sistema de señal, tal como la peroxidasa. La prueba puede realizarse a partir de muestras de diversa entidad, entre ellas, suero sanguíneo (Saliki et al. 2000). Se han desarrollado numerosos kits comerciales con este fin, utilizando tanto anticuerpos monoclonales como policlonales. En particular, Bauermann et al (2012) probaron que el test HERDCHEK BVDV ag/ Serum (IDEXX) detecta vDVB tipo 1 y 2 y los virus tipo Ho-Bi.

1.5.3 Identificación del genoma viral

A pesar de que la variabilidad antigénica entre las cepas del virus puede ser utilizada para diferenciar especies, el sistema más eficiente, se basa en el análisis genómico (Ridpath, 2003). Para la detección del ácido nucleico viral el método más difundido es la Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT- PCR), el cual es más sensible que el

ELISA y no es afectado por la presencia de anticuerpos (Horner, 1995; Zimmer et al. 2004; Goyal, 2005).

Para diferenciar entre las especies de *Pestivirus* fueron desarrolladas numerosas pruebas moleculares, para las cuales han sido utilizados ampliamente los cebadores 324F-326R (panpestivirus) descritos por Vilcek et al. (1994). En el genoma de los *Pestivirus*, la región 5' UTR es altamente conservada, por lo tanto, existe una alta homología en la secuencia nucleotídica de dicho fragmento entre los diversos aislamientos (Ridpath et al. 1994; Ridpath & Bolin, 1998; Flores et al. 2002). A pesar de ello, se han identificado en 5' UTR dos regiones variables que se utilizan como base para la caracterización viral de ambos genotipos del vDVB (Ridpath & Bolin, 1998). La detección de virus emergentes, es más limitada, así como la posibilidad de diferenciarlos de vDVB -1 y vDVB -2 (Bauermann et al. 2014b). Algunas pruebas moleculares han sido desarrolladas, a nivel de investigación, en base a diversas regiones del genoma. En particular, Bauermann et al. (2014a), describen cebadores específicos para la detección de la región 5'UTR, en los virus tipo Ho-Bi, logrando un 83% de especificidad. La coinfección con cepas de vDVB tipo 1, vDVB tipo 2 y cepas de los virus tipo Ho-Bi ha sido reportada tanto a nivel experimental como a nivel de campo (Bauermann et al. 2014a; Bauermann et al. 2016). Mediante la técnica de secuenciación, a partir de los productos obtenidos de la RT-PCR, se obtienen las secuencias nucleotídicas. A través del *análisis in silico* (alineamiento y análisis filogenético) las mismas pueden ser caracterizadas.

2 ANTECEDENTES

2.1 En nuestro país

En nuestro país la primera detección del virus fue realizada en la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE): "M. C. Rubino", por la técnica de Inmunohistoquímica, hasta entonces, la enfermedad era sospechada clínicamente en nuestro ganado (César, 1996) Los antecedentes de estudios de detección de anticuerpos, tanto en rodeos de carne como de leche, han revelado una alta prevalencia de la infección: 60 a 72% a nivel individual y 97 al 100% a nivel predial (Saizar & Gil, 1998; Mederos & Hirigoyen, 1998; Repiso et al. 2005). El primer estudio genómico del virus realizado con cepas uruguayas reveló la presencia del genotipo 1 (1a 1b y 1c (?)) con una alta homología con las cepas de referencia, y del genotipo 2, esta secuencia resultó similar a la cepa Soldán de Brasil pero distante de las cepas de referencia cd87 y 890 (Guarino et al. 2000). Recientemente, Maya et al. (2015) caracterizaron 14 cepas bovinas provenientes de los departamentos de Tacuarembó, Rivera y Florida que agruparon dentro de vDVB tipo 1 (1a, 1i) y vDVB tipo 2 (2b).

2.2 Antecedentes de caracterización molecular en la región

2.2.1 Brasil:

Se reportaron vDVB tipo 1 (1a, 1b, 1d, 1e, 1i) y vDVB tipo 2 (2a, 2b, 2c) (Flores et al. 2002; Vilcek et al. 2004; Cortez et al. 2006; Bianchi et al. 2011; Weber et al. 2014b; Silveira et al. 2015; Mósena et al. 2017b). A partir del hallazgo de un nuevo virus contaminando suero fetal bovino proveniente de Brasil (Schirrmeyer et al. 2004), fueron identificadas otras cepas genéticamente relacionadas. Las cuales han sido aisladas tanto en bovinos sintomáticos y con infección persistente (Cortez et al. 2006; Bianchi et al. 2011; Silveira et al. 2015; Cortez et al. 2017) así como en un cuadro similar a la enfermedad de las mucosas (Weber et al. 2014a) y en un búfalo de agua (Stalder et al. 2005). En un estudio epidemiológico sobre pestivirus en rumiantes, en el Noroeste de Brasil, Silveira et al. (2017), afirman que es el más prevalente. La identificación de estos virus emergentes en múltiples regiones, sumado a la evidencia de que se ha detectado una importante cantidad de lotes de sueros fetales brasileños contaminados, sugiere que los mismos son endémicos en el país (Bauerman & Ridpath, 2015).

La distribución actual de los virus Ho-Bi, reportados tanto en animales sintomáticos (bovinos y búfalos) como en productos biológicos se muestra en la figura 9.

2.2.2 Argentina:

Se ha reportado la circulación de vDVB tipo 1 (1a, 1b, 1c) y vDVB tipo 2 (2a, 2b) (Jones et al. 2001; Odeón et al. 2003; Jones & Weber, 2004; Vilcek et al. 2004; Gollán et al. 2006; Pecora et al. 2014). A partir del análisis PNS en secuencias depositadas en GenBank reportadas previamente por Jones et al. (2001), Giangaspero et al. (2008) describen los subtipos 2c y 2d. Recientemente, Pecora et al. (2017) describen evidencias de circulación de virus tipo Ho-Bi en búfalos de agua.

2.2.3 Chile:

El único trabajo publicado hasta el momento describe la presencia de vDVB tipo 1 (1a, 1b, 1c) y vDVB tipo 2 subtipo 2a (Pizarro-Lucero et al. 2006).

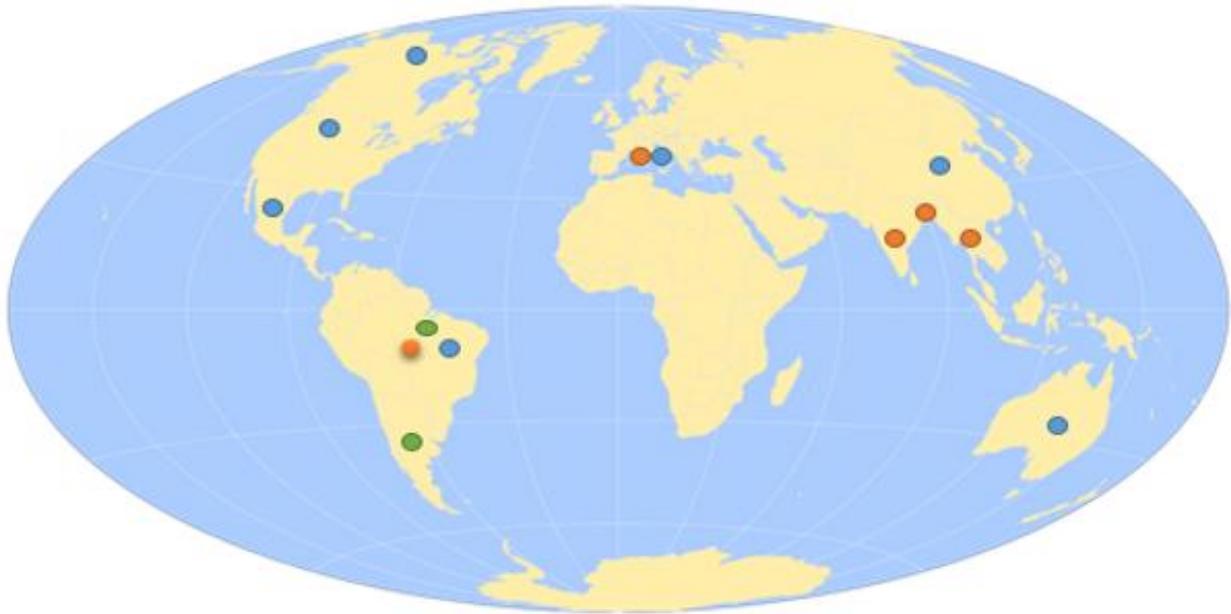


Figura 9. Distribución mundial actual de los virus tipo Ho-Bi. Detectados en suero fetal bovino (azul), en infecciones naturales en bovinos (naranja) y en búfalos de agua infectados (verde).

3 OBJETIVO GENERAL

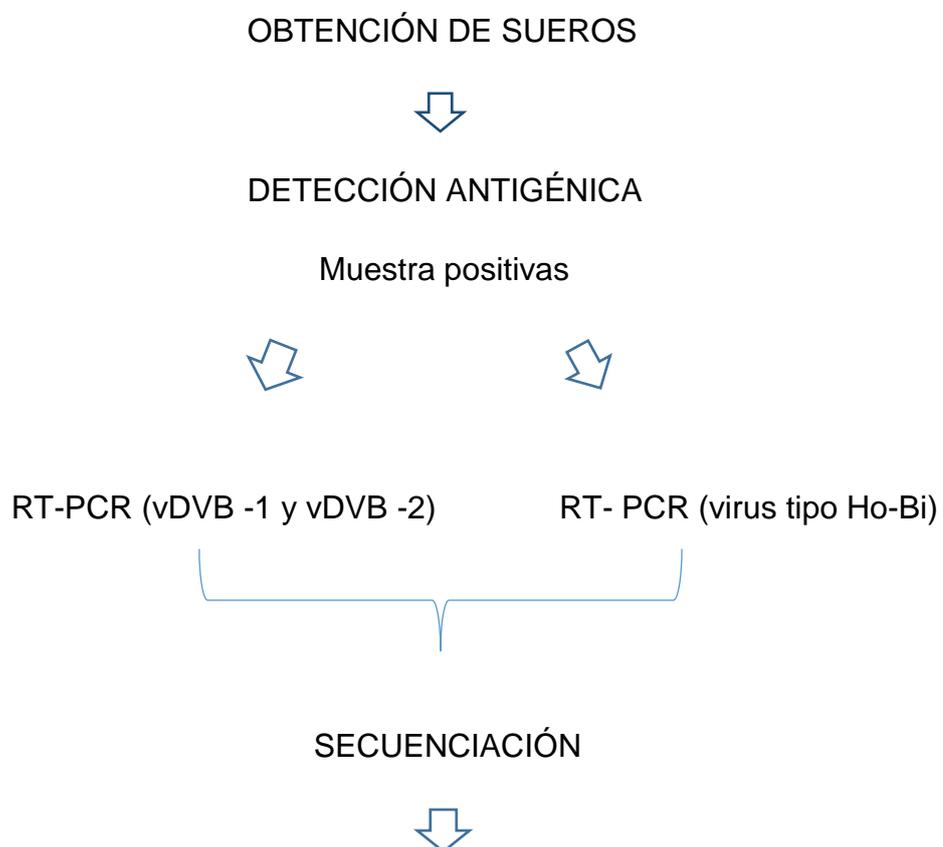
3.1 Objetivo general

Detectar y caracterizar genéticamente el virus de DVB en ganado bovino de nuestro país.

3.2 Objetivos específicos

- i) Detectar el virus a partir de suero sanguíneo por la técnica de ELISA antígeno.
- ii) Amplificar parte de la región 5'UTR del virus de DVB mediante la técnica de RT-PCR.
- iii) Obtener y analizar las secuencias nucleotídicas de los productos de la RT-PCR.
- iv) Comparar las cepas autóctonas con las de la región y con las de referencia mediante análisis filogenético.
- v) Generar una base de datos con las secuencias analizadas.
- vi) Monitorear la circulación de los virus tipo Ho-Bi.

4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



ANÁLISIS FILOGENÉTICO

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras y reactivos

Se obtuvieron 244 muestras de suero sanguíneo del banco de sueros de la DILAVE provenientes de novillos y vaquillonas (mayores de 6 meses) de carne y leche, colectadas entre 2014 y 2015.

Los sueros que estaban conservados en freezer a -20° C fueron transportados y guardados a -80° C en el laboratorio de serología del Departamento de Ciencias Microbiológicas de Facultad de Veterinaria hasta su procesamiento.

En el anexo II se detallan todos los reactivos utilizados en el trabajo.

5.2 Detección antigénica

Las muestras habían sido procesadas (DILAVE) por la técnica de ELISA antígeno de captura utilizando el kit comercial (a), el cual utiliza anticuerpos de captura monoclonales contra la glicoproteína gp 48 (E0/E^{ms}) de la envoltura viral. En nuestro laboratorio fueron testeadas mediante otro kit comercial (b). El mismo tiene adsorbidos a la placa, anticuerpos policlonales biotinilados contra la partícula viral completa.

Se realizaron tres pruebas en placas de 96 pocillos siguiendo las indicaciones del fabricante. La absorbancia se midió en espectrofotómetro (Labsystems Multiskan MS) a una longitud de onda de 450 nm. Se validó la técnica a partir de los cálculos realizados en base a los valores de DO (densidad óptica) obtenidos para los controles.

Se consideró positiva aquella muestra cuyo valor de DO corregida era $\geq 0,3$; sospechosa valores entre 0,2 y 0,3 y negativa $< 0,2$.

Para el cálculo de la muestra se utilizó la siguiente ecuación:

$$MUESTRA = \frac{DO\ muestra - DO\ control\ negativo}{DO\ control\ positivo - DO\ control\ negativo}$$

5.3 Detección molecular

De las muestras positivas, se seleccionaron 60, fuertemente positivas (DO >1) para la detección molecular teniendo en cuenta la capacidad de procesamiento con la que se contaba.

5.4 Extracción del ARN viral

El ARN viral fue extraído mediante un kit comercial (c) basado en el método de columna silica- gel, siguiendo el protocolo indicado. Brevemente, se basa en la lisis de la muestra con adición de tiocianato de guanidina, para la purificación del ARN se hacen varios pasos de centrifugación. La muestra se aplica a una columna de silica-gel que retendrá el ARN, el cual es eluido en el paso final a un volumen de 60 μ L para ser utilizado como templado en la prueba de RT-PCR.

5.5 RT-PCR

Al tratarse de un virus ARN, para la amplificación por PCR, es necesario realizar un paso previo de retrotranscripción (RT) el cual genera moléculas de DNA complementario (cDNA). Debido a que se utilizaron kits comerciales de un solo paso (d, e, f) ambas reacciones se llevaron a cabo simultáneamente en el mismo tubo.

5.5.1 RT-PCR detección vDVB tipo 1 y 2

Para la amplificación del cDNA se utilizó el par de oligonucleótidos o cebadores: 324-326 que hibridan en la posición 108-128 y 395-375 de la región 5' UTR, respectivamente, con lo cual, se obtiene un producto de 288 pb. (Vilcek et al. 1994). Las secuencias de dichos oligonucleótidos se especifican en el cuadro I.

Cuadro 1. Descripción de los oligonucleótidos para la detección de vDVB-1 y vDVB- 2.

TAMAÑO FRAGMENTO	SECUENCIA (5' - 3')	OLIGONUCLEÓTIDO
288 pb	ATGCCCWTAGTAGGACTAGCA	324 FORWARD
	TCAACTCCATGTGCCATGTAC	326 REVERSE

5.5.2 Reconstitución de los cebadores

A cada liofilizado de 19,6 nmoles de cebador se le adicionó 197 µL de agua desionizada, obteniéndose dos tubos de soluciones madre a una concentración de 100 µM. Para utilizarlos en la PCR a una concentración de 10 µM fueron diluïdos 1/10. Se prepararon así dos eppendorf conteniendo un volumen de 100 µL, uno por cada cebador. Las soluciones madre se conservaron en freezer a – 20 °C.

5.5.3 Mix de reacción

Con el kit (d), se preparó una premezcla (volumen final de 25 µL) de acuerdo a las siguientes condiciones: 12,5 µL de mezcla de reacción 2X, 1 µL de la mezcla de enzimas (incluye SuperScript III RT y Platinum Taq High Fidelity polimerasa, Invitrogen), 1 µL de cada oligo [10uM], 7,5 µL de agua libre de ARNasas. A la cual se le agregó 3 µL de la muestra.

La prueba se llevó a cabo en un termociclador PERKIN ELMER GeneAmp 2400 de acuerdo al protocolo descrito en el cuadro II.

Cuadro 2. Protocolo nº1: ciclos de RT- PCR para la detección de vDVB-1 y vDVB- 2.

Nº pasos	Nº ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
Pre- PCR				
1	1	RT- activación	50 °C	30´
		RT- desactivación	94 °C	3´
PCR				
3	40	Desnaturalización	94 °C	30´´
		Hibridación	55 °C	30´´

		Extensión	68 °C	1´
PASO FINAL				
1	1	Extensión Final	68 °C	5´

Con el kit (e), se preparó una premezcla (volumen final de 25 µL) de acuerdo a las siguientes condiciones: 6 µL de mezcla de reacción 2X (5 µL de buffer y 1 µL de dNTPs), 1 µL de la mezcla de enzimas (incluye Sensiscript RT y la HotStar Taq polimerasa, Qiagen), 1,5 µL de cada oligo [10uM], 13 µL de agua libre de RNasa.

La prueba se llevó a cabo en el mismo equipo de acuerdo al protocolo descrito en el cuadro III.

Cuadro 3. Protocolo n°2: ciclado de RT-PCR para la detección de vDVB-1 y vDVB-2.

Nº pasos	Nº ciclos	Etapa	Temperatura	Tiempo
Pre- PCR				
1	1	RT- activación	55 °C	30´
		RT- desactivación	95 °C	15´
PCR				
3	40	Desnaturalización	94 °C	30´´
		Hibridación	55 °C	30´´
		Extensión	72 °C	1´
PASO FINAL				
1	1	Extensión Final	72 °C	10´

Se utilizaron como controles positivos cepas de referencia del vDVB tipo 1 (NADL) y del vDVB tipo 2 (890), obtenidas de la DILAVE y como control negativo, agua libre de RNasa.

5.6 RT-PCR virus tipo Ho-Bi

Se utilizaron los cebadores N2- R5 específicos para la detección de los virus tipo Ho-Bi; amplificándose un fragmento de 150pb de la región 5´UTR (Bauermann et. al. 2014b). En el cuadro IV se muestra las secuencias de los oligonucleótidos.

Cuadro 4: Descripción de los oligonucleótidos para la detección de los virus tipo Ho-Bi.

TAMAÑO FRAGMENTO	SECUENCIA (5' - 3')	OLIGONUCLEÓTIDOS
150 pb	TAGCAGGTCTCTGCAACACCCTAT	R5 FORWARD
	TCGACGCATCAAGGAATGCCT	N2 REVERSE

5.6.1 Reconstitución de los cebadores

A un liofilizado de 25,1 nmoles del cebador R5 y 22,8 nmoles del N2 se le adicionó un volumen de 251 µL y 228 µL de agua desionizada, respectivamente, obteniéndose dos soluciones madre a una concentración de 100 µM cada una. Para utilizarlos en la PCR a una concentración de 10 µM, fueron diluidos 1/10. Se prepararon así dos eppendorf conteniendo un volumen de 100 µL, uno para cada cebador. Las soluciones madre se mantuvieron en freezer a - 20 °C.

5.6.2 Mix de reacción

Con el kit (d) se preparó una premezcla (volumen final de 25 µL) de acuerdo a las siguientes condiciones: 12,5 µL de mezcla de reacción 2X, 1 µL de la mezcla de enzimas, 1,25 µL de cada oligo [10uM], 6 µL de agua libre de ARNasa. A la cual se le agregó 3 µL de la muestra.

Con el kit (f) se preparó una premezcla (volumen final de 25 µL) de acuerdo a las siguientes condiciones: 12,5 µL de mezcla de reacción 2X, 2 µL de la mezcla de enzimas (SuperScript III RT y Platinum Taq DNA polimerasa, Invitrogen), 1 µL de cada oligo [10uM], 6,5 µL de agua libre de ARNasas. A la cual se le agregó 2 µL de la muestra.

La prueba se llevó a cabo en un termociclador PERKIN ELMER GeneAmp 2400 de acuerdo al protocolo esquematizado en el cuadro V.

Cuadro 5. Protocolo nº3: ciclado de RT- PCR para la detección virus tipo Ho-Bi.

Nº pasos	Nº ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
Pre- PCR				
1	1	RT- activación	55 °C	25´

		RT- desactivación	94 °C	2´
PCR				
3	35	Desnaturalización	94 °C	30´´
		Hibridación	55 °C	30´´
		Extensión	68 °C	25´´
PASO FINAL				
1	1	Extensión Final	68 °C	5´

En todos los casos, se utilizó como control positivo la cepa SV 478/07, cedida por el laboratorio de virología de la Universidad de Santa María, Brasil; como control negativo se utilizó agua libre de RNasa.

5.7 Electroforesis

Los amplicones obtenidos en todos los ensayos de RT- PCR se corrieron en geles de agarosa al 2 %. Para ello 0,8 gramos de agarosa se fundieron en 40 mL de tampón TAE (g) a 100 °C. Después de enfriar se agregó 4 µL de colorante de tinción (h). La solución se vertió en cubeta y se dejó gelificar, una vez prontos los pocillos se cargaron en el gel 5 µL de cada muestra, junto a 2 µL de buffer de carga, lo mismo para los controles. El marcador de peso molecular estándar (i) se utilizó a un volumen de 6 µL, preparado de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las corridas electroforéticas se realizaron a 120 V, 500 mA por 35 minutos. Los geles se observaron en transiluminador con luz UV.

5.8 Purificación de los amplicones

Un porcentaje de las muestras positivas fueron purificadas en nuestro laboratorio, mientras que para otras se solicitó el servicio a Macrogen, Inc. Previo a la purificación, se sembraron en gel de agarosa al 2%, a un volumen final de 20 µL (15 µL DNA con 5 µL de buffer de carga). Luego de la corrida, las bandas se escindieron del gel en pequeños trozos. La purificación se realizó con un kit comercial (j) según indicaciones del fabricante. Las muestras fueron eluidas en un volumen final de 30 µL, de los cuales se utilizaron 5 µL para una nueva corrida.

5.9 Cuantificación del ADN purificado

La concentración del ADN obtenido se determinó por medición espectrofotométrica a 260 nm, utilizando un equipo NanoDrop Spectrophotometer ND1000, en 1 µL de muestra. El laboratorio secuenciador solicita que las mismas posean una concentración mayor a 10 ng/µL.

5.10 Secuenciación

De cada fragmento se solicitó la secuenciación de ambas cadenas de ADN, utilizando los mismos cebadores que para la reacción de RT-PCR. La secuenciación automática fue realizada en MacroGen Inc., Seúl, Corea del Sur.

5.11 Análisis filogenético

Para la edición y ensamblaje de las cromatogramas se utilizaron los programas:

BioEdit 7.1.3.0 y FinchTV v1.4, sitios web: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> y (<http://finchtv.software.informer.com/1.4/>), respectivamente.

Para el alineamiento de las secuencias se manejó el programa phylogeny on-line (www.phylogeny.fr) que dispone de múltiples herramientas para realizar el alineamiento: MUSCLE, Clustal W, ProbCons. A partir de estos alineamientos se utilizó el programa T – Coffee, on- line (www.ebi.ac.uk), para determinar el score como parámetro para elegir el mejor resultado.

El análisis filogenético se realizó en base al método de inferencia Máxima Verosimilitud de amplio uso para la caracterización de secuencias virales. El mismo se ejecutó en el programa PhyML (www.atgc-montpellier.fr/phyml) el cual estima el modelo evolutivo más ajustado para el set de datos y calcula el soporte estadístico de los nodos mediante aLRT (approximate likelihood ratio test). La edición del árbol filogenético se realizó mediante el programa Fig Tree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Se incluyeron en la filogenia cepas de referencia y de la región (Argentina y Brasil) así como las que han sido reportadas para nuestro país. Como grupo externo se agregó una cepa del virus de la enfermedad de la frontera (Becher et al. 1994). Todas fueron obtenidas del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y se muestran en el cuadro VI.

Las distancias genéticas entre las secuencias analizadas (distancia p) se calcularon con el software MEGA v7.0 (Kumar et al. 2016).

Cuadro 6. Secuencias incluidas en nuestro estudio obtenidas del GenBank.

NOMBRE	Nº ACCESO	CARACTERIZACIÓN	PROCEDENCIA
408TboUY/072014	KT833787	BVDV-1a	Uruguay
409TboUY/072014	KT833788	BVDV-1a	Uruguay
429TboUY/082014	KT833789	BVDV-1a	Uruguay
430TboUY/082014	KT833790	BVDV-1a	Uruguay
431TboUY/082014	KT833791	BVDV-1a	Uruguay
432TboUY/082014	KT833792	BVDV-1a	Uruguay
433FaUY/032014	KT833793	BVDV-1a	Uruguay
434FaUY/032014	KT833784	BVDV-1a	Uruguay
435FaUY/032014	KT833794	BVDV-1a	Uruguay
437TboUY/042014	KT833796	BVDV-1a	Uruguay
438TboUY/042014	KT833797	BVDV-1a	Uruguay
653TboUY/082014	KT833798	BVDV-1a	Uruguay
68.88	AF244962	BVDV-1a	Argentina
Singer	DQ88995	BVDV-1a	Estados unidos
Osloss	M96687	BVDV-1b	Estados unidos
66.1	AF244953	BVDV-1b	Argentina
Bega	KF896608	BVDV-1c	Australia
2B	AF244957	BVDV-1c	Argentina
Deer	AB040132	BVDV-1c	Japón
F-Au	AF298065	BVDV-1d	Austria
1084	AF298054	BVDV-1e	Francia
W	AF298073	BVDV-1f	Austria
A	AF298064	BVDV-1g	Austria
G	AF298066	BVDV-1h	Austria
436FaUY/052014	KT833795	BVDV-1i	Uruguay
ACM/BR/2016	KX857724	BVDV- 1i	Brasil
23-15	AF298059	BVDV- 1i	Reino Unido
KS86-1ncp	AB078950	BVDV-1j	Japón
ZM-95	AF526381	BVDV-1m	China
TJ06	GU120246	BVDV-1p	China

SD0803	JN400273	BVDV-1q	China
CA181/10	LM994672	BVDV-1r	Italia
UM136/08	LM994673	BVDV-1s	Italia
SI207/12	LM994674	BVDV-1t	Italia
890	U18059	BVDV-2a	Estados Unidos
95/008	AY273777	BVDV-2a	Argentina
76/08	JX848364	BVDV-2a	Argentina
439RvUY/082014	KT833799	BVDV-2b	Rivera
Soldán	U94914	BVDV-2b	Brasil
VS63	AF410788	BVDV-2b	Brasil
LV96	AF410789	BVDV-2b	Brasil
VS123.4	AF410790	BVDV-2b	Brasil
34B	AF244952	BVDV-2b	Argentina
86275	JX679696	BVDV-2b	Argentina
VOE4407	HG426495.1	BVDV-2c	Alemania
LV/CRFK56/14	KP715134.1	BVDV-2c	Brasil
D32/00_ HoBi	AB871953	BVDV-3	Brasil
SVA/cont-08	FJ232692	BVDV-3	Sudamérica
BR/G2	JN967729	BVDV-3	Brasil
X818	NC003679	BDV	Australia

6 RESULTADOS

6.1 Resultados serológicos

De las 244 muestras de suero positivas al test de ELISA procesadas con el kit (a) resultaron nuevamente positivas 153 (62,7 %), utilizando el kit (b); 7 muestras sospechosas (2,9 %) y las restantes 84 fueron negativas (34,4 %). A modo de ejemplo, en la figura 10 se muestra una de las placas del ensayo ELISA.

A partir de estos resultados se procesaron 60 sueros positivos altos ($DO > 1$) los cuales se analizaron con los dos ensayos moleculares ($n=120$).

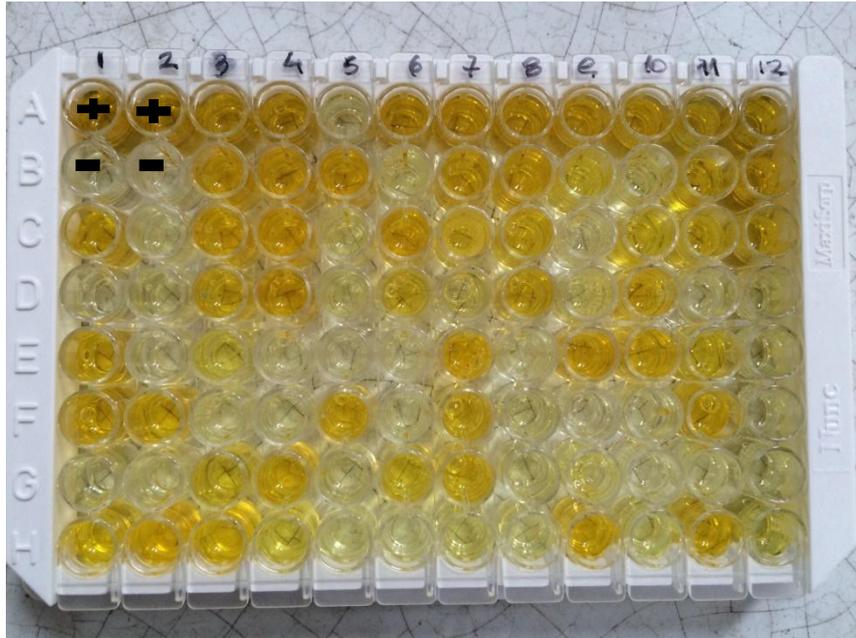


Figura 10. Ensayo de ELISA antígeno de captura para vDVB, en la foto se señala la ubicación de los controles.

6.2 Resultados moleculares

En la prueba de RT-PCR para la detección de las dos especies del virus (vDVB-1 y vDVB-2), se obtuvieron 50 muestras positivas (83,3 %). En la figura 11 se muestra, a modo de ejemplo, uno de los geles de electroforesis realizados. Dos de estas muestras fueron descartadas para la secuenciación ya que la concentración de DNA obtenido no fue suficiente (< 10 ng/ul).

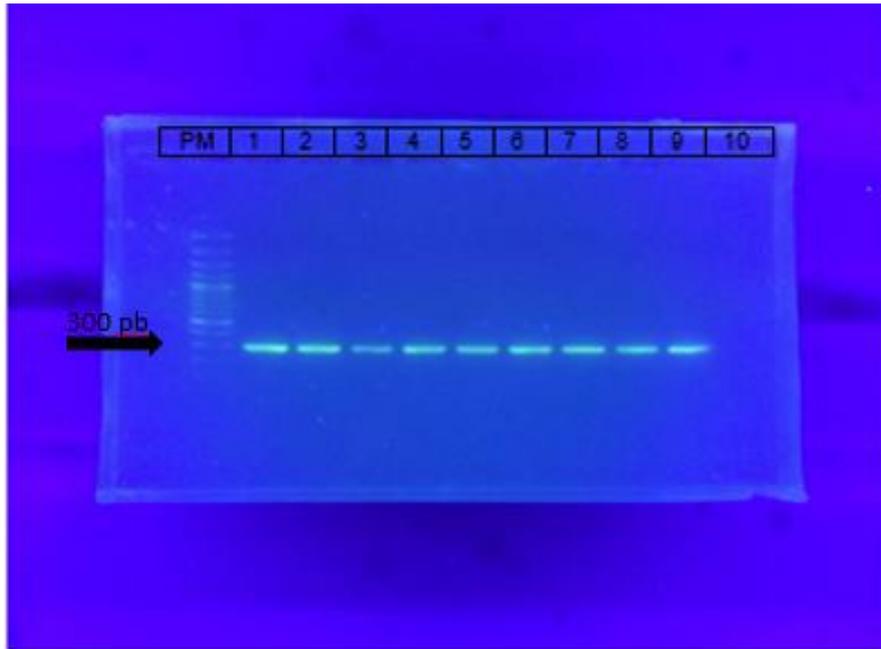


Figura 11. Gel de electroforesis obtenido del ensayo de RT-PCR para vDVB-1 y vDVB- 2. PM: 100 pb; pocillos 1-7: muestras positivas; pocillos 8 y9: controles positivos cepas 1 y 2, pocillo 10: control negativo.

Resultaron negativas 10 muestras (16,7 %) que no se volvieron a analizar por cuestiones presupuestales.

No se detectaron muestras positivas en la RT-PCR para la detección de los virus tipo Ho-Bi. La figura 12 muestra uno de los geles realizados, donde se observa la amplificación del control positivo utilizado como referencia.

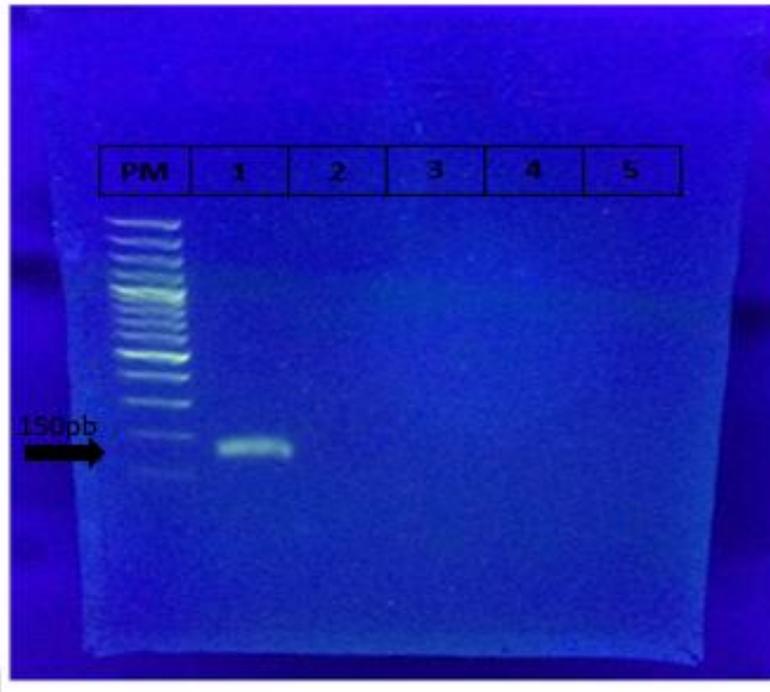


Figura 12. Gel de electroforesis del ensayo de RT-PCR para los virus tipo Ho-Bi. PM: 100 pb; pocillo 1: control positivo; pocillo 2: control negativo; pocillos 3-5: muestras negativas.

De los 50 amplicones obtenidos fueron descartados dos de ellos para la secuenciación, puesto que no se obtuvo la suficiente cantidad de ADN luego de la purificación. De las 48 muestras secuenciadas, se obtuvieron 42 de buena calidad para el análisis bioinformático.

6.3 Resultados del análisis *in silico*

Se partió del alineamiento realizado por el programa MUSCLE una vez evaluados los scores, que fueron: ProbCons 1.12 = 783; Clustal W 2.1 = 874; MUSCLE 3.8.3 = 884.

El modelo de sustitución obtenido del programa PhyML fue: GTR + G (gamma = 0,375) para el análisis de Máxima Verosimilitud.

La filogenia obtenida se muestra en la figura 13. El árbol filogenético muestra que 40 de 42 secuencias se agruparon como vDVB- 1 (aLRT=0,88). Esto representaría el 95,2 % del total, de ellas, 36 corresponden al subtipo 1a (90 %), formando un cluster con las cepas 1a previamente reportadas en nuestro país, pero separado de las cepas de referencia y de la región incluidas en el estudio (aLRT=0,90). Las otras 4 cepas: 38URU/2017, 39URU/2017, 15URU/2017, 20URU/2017 que corresponden al 10 % restante de vDVB-1, aparecen relacionadas a las cepas 1i de referencia (Brasil y Reino Unido) y la cepa KT833795

descrita previamente para Uruguay. Dentro de ellas, dos cepas: 15URU/2017 y 20URU/2017 tienen un soporte estadístico significativo ($aLRT=0,82$) y las restantes: 38URU/2017 y 39URU/2017 tienen soporte algo más débil ($aLRT=0,77$).

Con el fin de mejorar la asignación de las cepas del subtipo 1i en base a la filogenia se calcularon los porcentajes de identidad nucleotídica por medio de la distancia genética (distancia p). Las cepas 15URU/2017 y 20URU/2017 presentaron 100 % de identidad entre ellas, mientras que las cepas 38URU/2017 y 39URU/2017 mostraron un 98,3 %. Además, en relación a la cepa uruguaya KT833795 se obtuvieron para las cepas 15URU/2017 y 20URU/2017 un 91 % de homología y para las cepas 38URU/2017 y 39URU/2017: 92 % y 90 %, respectivamente. En cuanto a su relación con respecto a las demás cepas de vDVB1 se vio que las secuencias 15URU/2017 y 20URU/2017 varían entre 87,3 % y 94,5 %; mientras que las cepas 38URU/2017 y 39URU/2017 varían entre 87,6 % y 99 %. En relación a las cepas del vDVB -2 las secuencias 15URU/2017 y 20URU/2017 varían entre 74 % y 81 % y las secuencias 38URU/2017 y 39URU/2017 lo hacen entre un 74,6 % y 83,9 %. Por último, en relación a las cepas de virus tipo Ho-Bi, la divergencia es mayor, siendo de 73,8 % a 74,7 % para las cepas 15URU/2017 y 20URU/2017 y de 73,1 % a 76,9 % para las cepas 38URU/2017 y 39URU/2017. Estos resultados se muestran en el cuadro VII.

Utilizando el mismo programa, también se calculó el promedio de las distancias p entre las cepas del clado 1i. Este valor fue de 0,06 el cual se corresponde con una identidad promedio de 94 % para todo el grupo.

Cuadro 7. Cálculo de la distancia p para las cepas caracterizadas como 1i en relación a las cepas de referencia y las cepas uruguayas antes reportadas.

	15URU/2017	20URU/2017	38URU/2017	39URU/2017
15URU/2017				
20URU/2017	0,000			
38URU/2017	0,006	0,006		
39URU/2017	0,006	0,006	0,017	
KT833795.1_vDVB_1i	0,091	0,091	0,082	0,097
KX857724.1_vDVB_1i	0,083	0,083	0,064	0,086
AF298059.1_vDVB_1i	0,078	0,078	0,071	0,076
NC_003679.1_Border_disease	0,299	0,299	0,278	0,290
LM994674.1_vDVB_1t	0,113	0,113	0,103	0,112
AF298066.1_vDVB_1h	0,111	0,111	0,084	0,106
AF298065.1_vDVB_1d	0,102	0,102	0,090	0,099
M96687.1_vDVB_1b	0,108	0,108	0,104	0,117
AF244953.1_vDVB_1b	0,085	0,085	0,086	0,096
AF298073.1_vDVB_1f	0,123	0,123	0,103	0,117
LM994672.1_vDVB_1r	0,114	0,114	0,092	0,107
AF298064.1_vDVB_1g	0,119	0,119	0,090	0,117
LM994673.1_vDVB_1s	0,121	0,121	0,103	0,124
AF526381.3_vDVB_1m	0,173	0,173	0,122	0,150
JN400273.1_vDVB_1q	0,092	0,092	0,090	0,103
GU120246.1_vDVB_1p	0,127	0,127	0,096	0,117
AF298054.1_vDVB_1e	0,102	0,102	0,096	0,117
KT833791.1_vDVB_1a	0,086	0,086	0,102	0,106
KF896608.1_vDVB_1c	0,069	0,069	0,064	0,080
AB040132.1_vDVB_1c	0,078	0,078	0,041	0,064
AB078950.1_vDVB_1j	0,055	0,055	0,044	0,056
AF244957.1_vDVB_1c	0,072	0,072	0,040	0,054
KT833796.1_vDVB_1a	0,054	0,054	0,020	0,027
KT833797.1_vDVB_1a	0,048	0,048	0,020	0,027
DQ088995.2_vDVB_1a	0,032	0,032	0,023	0,035
KT833790.1_vDVB_1a	0,032	0,032	0,031	0,027
KT833784.1_vDVB_1a	0,027	0,027	0,031	0,027
KT833787.1_vDVB_1a	0,032	0,032	0,041	0,035
AF244962.1_vDVB_1a	0,025	0,025	0,013	0,018
KT833788.1_vDVB_1a	0,032	0,032	0,041	0,035
KT833789.1_vDVB_1a	0,027	0,027	0,031	0,027
KT833792.1_vDVB_1a	0,011	0,011	0,010	0,009
KT833798.1_vDVB_1a	0,011	0,011	0,010	0,009
KT833794.1_vDVB_1a	0,022	0,022	0,020	0,018
KT833793.1_vDVB_1a	0,027	0,027	0,031	0,035
AB871953.1_vDVB_3	0,253	0,253	0,231	0,243
JN967729.1_vDVB_3	0,262	0,262	0,253	0,269
FJ232692.1_vDVB_3	0,258	0,258	0,247	0,263
AY273777.1_vDVB_2a	0,260	0,260	0,245	0,254
KT833799.1_vDVB_2b	0,222	0,222	0,163	0,186
AF410790.1_vDVB_2b	0,237	0,237	0,163	0,204
AF410788.1_vDVB_2b	0,222	0,222	0,163	0,186
U94914.1_vDVB_2b	0,216	0,216	0,161	0,180
AF410789.1_vDVB_2b	0,249	0,249	0,184	0,212
JX679696.1_vDVB_2b	0,238	0,238	0,196	0,215
AF244952.1_vDVB_2b	0,239	0,239	0,185	0,205
HG426495.1_vDVB_2c	0,189	0,189	0,174	0,190
KP715134.1_vDVB_2c	0,217	0,217	0,186	0,199
U18059.1_vDVB_2a	0,201	0,201	0,195	0,208
JX848364.1_vDVB_2a	0,249	0,249	0,209	0,233

Dos secuencias corresponden a la especie vDVB-2, representando el 4,8 % del total muestreado (aLRT=0,83). Ambas: 32URU/2017 y 33ROU/2017 se caracterizaron como subtipo 2b (aLRT=0,99) en un cluster formado por cepas argentinas: AF244952, JX679696; brasileras: cepa de referencia Soldán (U94914) y AF410788, AF410789, AF410790 y el aislado uruguayo (KT833799).

El cuadro VIII representa la genotipificación de las cepas estudiadas y su número de acceso a la base de datos del Genbank.

Cuadro 8. Caracterización de las cepas estudiadas y su número de acceso al GenBank.

CARACTERIZACIÓN	NOMBRE	Nº ACCESO
vDVB- 1 subtipo 1a	1URU/2017 2URU/2017 3URU/2017 4URU/2017 5URU/2017 6URU/2017 7URU/2017 8URU/2017 9URU/2017 10URU/2017 11URU/2017 12URU/2017 13URU/2017 14URU/2017 16URU/2017 17URU/2017 18URU/2017 19URU/2017 21URU/2017 22URU/2017 23URU/2017 24URU/2017 25URU/2017 26URU/2017 27URU/2017 28URU/2017 29URU/2017 30URU/2017 31URU/2017 34URU/2017 35URU/2017 36URU/2017 37URU/2017 40URU/2017 41URU/2017 42URU/2017	MG923910 MG923911 MG923912 MG923913 MG923914 MG923915 MG923916 MG923917 MG923918 MG923919 MG923920 MG923921 MG923922 MG923923 MG923925 MG923926 MG923927 MG923928 MG923930 MG923931 MG923932 MG923933 MG923934 MG923935 MG923936 MG923937 MG923938 MG923939 MG923940 MG923941 MG923942 MG923943 MG923944 MG923947 MG923948 MG923949
vDVB-1 subtipo 1i	15URU/2017 20URU/2017 38URU/2017 39URU/2017	MG923924 MG923929 MG923945 MG923946
vDVB-2 subtipo 2b	32URU/2017 33URU/2017	MG923950 MG923951

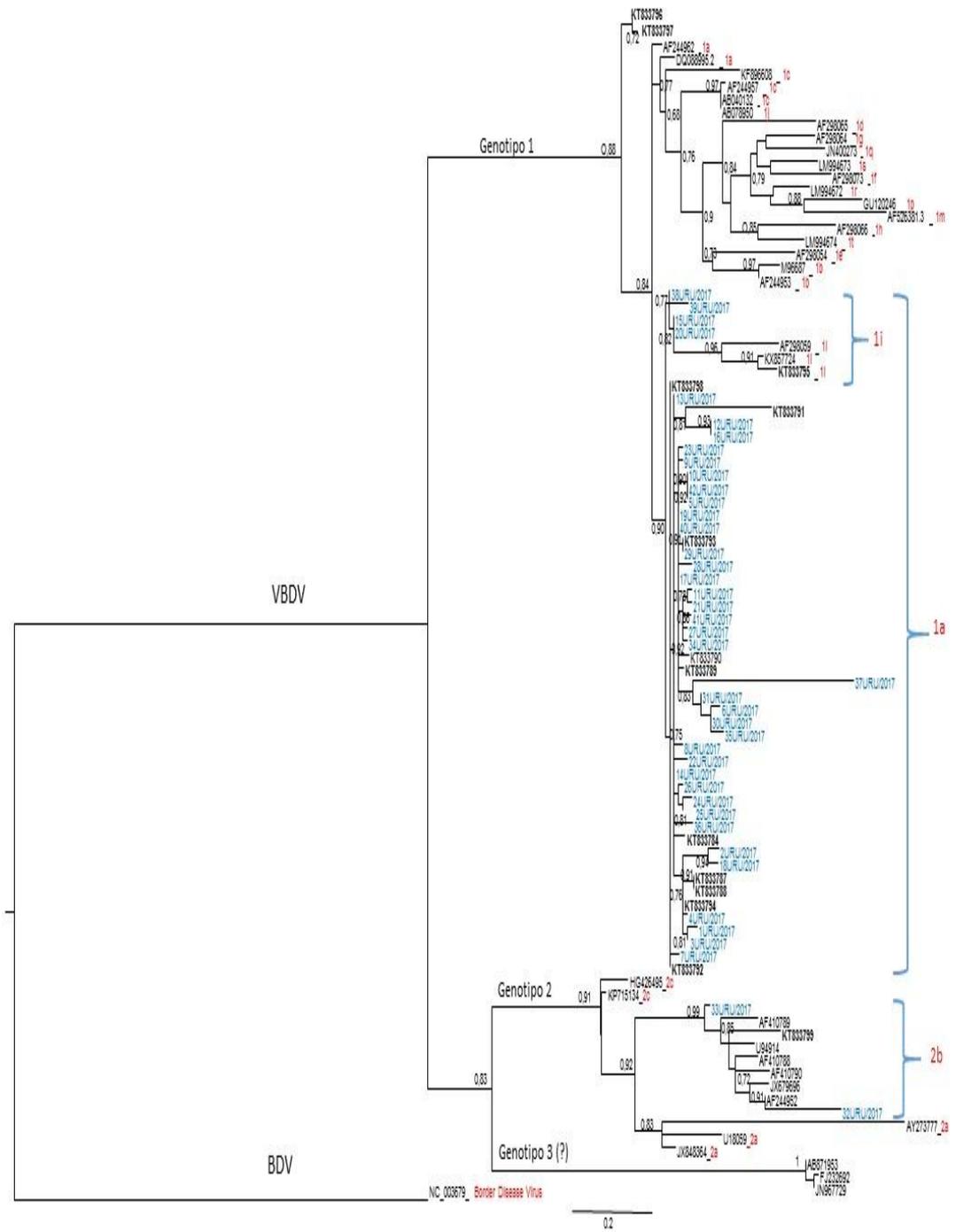


Figura 13. Árbol filogenético basado en la región 5'UTR, método Máxima Verosimilitud. Incluye secuencias de referencia mundial, de la región y las cepas uruguayas antes reportadas (en negrita). Nuestras cepas se muestran en azul.

7 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

7.1 Comparación entre los ensayos ELISA

De las 244 muestras de suero positivas al antígeno viral se recuperaron 153, que fueron nuevamente positivas (62,7%). En el primer procesamiento se había utilizado el kit comercial (a), el cual utiliza anticuerpos de captura monoclonales contra la glicoproteína gp 48 (E0/E^{ms}) de la envoltura viral. El segundo testeo se realizó utilizando el kit comercial (b), el cual presenta, adsorbidos a la placa, anticuerpos policlonales biotinilados contra la partícula viral.

Si bien no se pudo comparar la sensibilidad entre los kits, por el hecho de que no se analizaron muestras negativas por ambos métodos, se pudo observar que el kit (b) detecto un porcentaje muy inferior de muestras positivas. Ello podría deberse a la utilización de diferentes principios de captura viral o bien al cambio en las condiciones del laboratorio.

7.2 Comparación entre ensayo ELISA y RT-PCR

De las 153 muestras positivas a ELISA, se procesaron 60 para cada uno de los dos ensayos moleculares (n=120). En la prueba de RT-PCR para la detección de vDVB -1 y vDVB -2 se obtuvieron 50 amplicones (83,3 %) y 10 muestras resultaron negativas (16,7 %). Estas no volvieron a testearse por cuestiones presupuestales. Diferentes condiciones podrían haberse dado para explicar ese resultado. Por un lado, las muestras fueron procesadas en diferentes momentos, tanto la etapa de extracción del ARN como la prueba RT-PCR propiamente dicha. Por otro lado, durante el proceso de extracción del ARN pudo haber errores que generaran un producto de baja cantidad o calidad. Es sabido que este es sumamente sensible a las RNasa y a los cambios de temperatura, por lo tanto, la alteración de alguno de esos parámetros pudo provocar la degradación del genoma en una o más muestras. También podría atribuirse a errores en el pegado de los cebadores en el ensayo de RT-PCR así como a la enorme diversidad genética del virus. Actualmente, la RT-PCR convencional podría no detectar todas las cepas, especialmente todos los subtipos del vDVB tipo 1 descritos hasta el momento.

7.3 Diversidad de los *Pestivirus*

La existencia de un creciente número de subtipos ocurre principalmente como resultado de la acumulación en el tiempo de mutaciones puntuales, también conocida como deriva génica (Yesilbag et al. 2017).

La taxonomía de los *Pestivirus* cambia constantemente (en cuanto a la información generada por los diversos grupos de investigadores a nivel mundial). Esto se debe, por un lado, a la detección de nuevas especies, y por otro, debido a que no es uniforme el criterio utilizado para otorgar el status de especie y el sistema de división en subgrupos (Peterhans et al. 2010). No ha sido establecido un sistema internacional de reglas para discriminar y designar los subtipos del virus, lo cual ayudaría a reducir las inconsistencias en la tipificación molecular (Yesilbag et al. 2017).

7.4 Genotipificación

De las 48 cepas enviadas a secuenciar, se pudieron caracterizar 42, luego del análisis de los electroferogramas. La pérdida de estas secuencias podría explicarse por errores cuali o cuantitativos, por ejemplo, insuficiente pureza del ADN enviado.

El análisis filogenético de todas las muestras analizadas mostró, como se ha reportado previamente, que las cepas están separadas en dos cluster, correspondientes al vDVB tipo 1 y 2 con valores de aLTR= 0,88 y 0,83, respectivamente (Pellerin et al. 1994; Ridpath et al. 1994). En la literatura, Liu et al. (2009b) cita un tercer cluster formado por los virus tipo Ho-Bi, que propone como vDVB- 3, que en nuestra topología surge como un grupo hermano del vDVB- 2 y dónde las cepas de referencia agrupan con un soporte de 1.

En concordancia con estudios previos realizados en nuestro país (Guarino et al. 2000; Maya et al. 2015) se observó que la mayoría de las cepas autóctonas se agrupan como vDVB- 1 (95,2 %), en particular, dentro del subtipo 1a (90%). En Brasil, también es el subtipo predominante (Weber et al. 2014b; Silveira et al. 2015), al igual que en Chile, donde también se ha descrito la presencia del subtipo 1c (Pizarro-Lucero et al. 2006). Por el contrario, en Argentina, Pecora et al. (2014) describen que el subtipo 1b es el más frecuente.

Analizando la topología de la filogenia aquí presentada se observa que nuestras cepas están distantes de dos de las cepas 1a incluidas en el estudio: la de referencia norteamericana Singer (DQ088995) y la argentina (AF244962). A su vez, nuestras cepas y las 1a previamente reportadas para Uruguay aparecen agrupadas con soporte aLRT=0,90 y la cepa argentina (AF244962) se ubica ancestral a todo el grupo con un aLRT de 0,84. Mientras que la cepa americana (DQ088995) se ubica ancestral a un conjunto de cepas caracterizadas como otros subtipos del vDVB-1. Esta inconsistencia podría explicarse por el tamaño del fragmento analizado en relación a la gran diversidad genética viral. Es probable que la información generada sea insuficiente para inferir las relaciones en algunos clados y además algunas ramas podrían tener un bajo soporte estadístico (Yesilbag et al. 2017).

Las cepas utilizadas como referencia del clado 1i fueron: el aislado uruguayo KT833795, la cepa brasilera KX875524 y la cepa de Reino Unido AF2498059. Este subtipo solo había sido reportado por Vilcek et al. (2001) en Reino Unido, hasta el 2015, cuando fue detectado

en Uruguay, departamento de Florida (Maya et al. 2015) y recientemente se describe por primera vez en Brasil, Rio Grande del Sur (Mósená et al. 2017b).

Si bien cuatro cepas del vDVB-1 aparecen agrupadas junto a las cepas de referencia del subtipo 1i, las secuencias 15URU/2017 y 20URU/2017 lo hacen con un soporte significativo mientras que las 38URU/2017 y 39URU/2017 tienen un soporte más débil. Éstas a su vez son secuencias algo más cortas por lo que tienen menos sitios informativos. Los resultados obtenidos en el cálculo de la similaridad promedio entre nuestras cepas y las 1i de referencia muestran una alta homología (94 %). A su vez entre las cepas 38URU/2017 y 39URU/2017 y la cepa uruguaya (KT833795) los porcentajes de similitud nucleotídicas son 92 % y 90 %, respectivamente. Por tanto, si bien en la filogenia los soportes estadísticos de las cepas 38 y 39 resultaron apenas significativos, del punto de vista de la secuencia estas cepas son más similares a las del subtipo 1i.

Un muestreo mayor y actualizado nos permitiría dilucidar si la variante 1i tiene una incidencia real en nuestros rodeos o se trató de una introducción puntual ocurrida en 2014, teniendo en cuenta que existió una homología temporal y espacial entre nuestro estudio y el reportado previamente.

Las cepas restantes de nuestro estudio: 32URU/2017 y 33URU/2017 se agruparon como vDVB-2 (4,8%), dentro del subtipo 2b, con un buen soporte estadístico ($aLRT=0,99$). Las mismas aparecen en un cluster junto a las cepas argentinas: AF244952, JX679696; brasileras: cepa de referencia Soldán (U94914) y AF410787, AF410788, AF410789, AF410790 y el aislado uruguayo (KT833799).

El bajo porcentaje de detección de la especie vDVB- 2 hace presumir que la circulación de este es mucho menor. Este resultado coincide con los estudios previos en nuestro país (Guarino et al. 2000; Maya et al. 2015). Mientras que, en Argentina, ha sido descrita la circulación de los subtipos 2a y 2b en la misma proporción (Pecora et al. 2014), en Chile solo se ha reportado el subtipo 2a (Pizarro-Lucero et al. 2006). En tanto, Silveira et al. (2015) han publicado un exhaustivo estudio retrospectivo mostrando la gran diversidad genética presente en Brasil. En este estudio se identifica por primera vez en el país el subtipo 2c, reportado anteriormente por Jenckel et al. (2014) en Alemania, a su vez, encuentran una alta proporción del subtipo 2b, lo cual se correlaciona con otros trabajos (Bianchi et al. 2011, Weber et al. 2014b). Por otro lado, este estudio no reporta la circulación del subtipo 2a, a diferencia del trabajo de Bianchi et al. (2010) en Rio Grande del Sur, lo que podría significar que la circulación de estas se encuentra circunscripta a esa zona geográfica.

La región 5' UTR ha sido establecida como estándar para la caracterización viral por lo que la mayoría de las secuencias disponibles en el GenBank se corresponden con la misma. A pesar de ello, cada vez más autores hacen notar sus limitaciones. La existencia de recombinantes implica un desafío para el análisis filogenético y la clasificación de los aislamientos, por ello, la genotipificación no debería basarse únicamente en un solo fragmento (Xia et al. 2007; Chernick et al. 2014; Weber et al. 2015; Yesilbag et al. 2017). Algunas inconsistencias han sido descritas por Tajima et al. (2004), demostrando que cepas que agrupaban en un determinado subtipo para la región 5'UTR quedaban

agrupadas de forma diferente cuando se estudiaban otras regiones. Varios autores han evaluado otras regiones como adecuadas, junto a 5'UTR, tales como: Npro y E2 (Becher et al. 1999; Vilcek et al. 2001; Chernick et al. 2014). Por lo tanto, entendemos de gran utilidad ampliar la región a secuenciar incluyendo otras regiones genómicas con el fin de obtener mayor número de sitios informativos y mejorar la resolución de la filogenia y en consecuencia, la precisión de la genotipificación.

7.5 Conclusiones finales

Los resultados obtenidos respecto a los dos ensayos de ELISA dejan de manifiesto que es importante considerar los distintos principios en que se basan los kits comerciales disponibles para minimizar tanto los posibles falsos negativos como falsos positivos. Futuros ensayos deben ser realizados para comparar un mayor número de sueros tanto positivos como negativos para BVD con el fin de confirmar estas diferencias encontradas.

Se recomienda el mantenimiento de muestras de suero sanguíneo a -80 °C, de lo contrario, puede ser un factor condicionante del resultado para el procesamiento por técnicas tales como RT- PCR.

En el presente estudio se caracterizaron 42 cepas del virus de diarrea viral bovina, determinándose la presencia del vDVB tipo 1 (subtipo 1a, 1i) y del vDVB tipo 2 (subtipo 2b). De ellas 40 corresponden al vDVB tipo 1 (95,2 %) por lo que confirmamos que es mucho mayor la distribución del mismo en nuestros rodeos en relación al vDVB tipo 2, representado por las dos cepas restantes (4,8 %).

Dentro del vDVB-1, el subtipo 1a es el más frecuente (90 %), al igual que se ha reportado en Brasil y Chile, pero no para Argentina y el resto de América. Las cuatro cepas restantes (10 %) correspondieron al subtipo 1i; el que ha sido reportado en América solamente en Uruguay y Brasil.

No se detectó la circulación de los virus tipo Ho-Bi, puesto que fueron negativas todas las muestras analizadas por RT-PCR.

La región 5' UTR ha sido establecida como estándar para la caracterización viral, sin embargo, las pruebas cada vez más contundentes en cuanto a la existencia de recombinantes plantea un desafío para la clasificación de los aislamientos. Varios autores han puesto de manifiesto que la caracterización del virus no debería basarse únicamente en un solo fragmento. Por lo tanto, entendemos necesario ampliar la región a secuenciar incluyendo otras regiones genómicas con el fin de obtener mayor número de sitios informativos y mejorar la resolución de la filogenia y como consecuencia, la precisión de la genotipificación.

El presente trabajo, por el número elevado de muestras analizadas, los resultados obtenidos y su comparación con las cepas de la región, constituye un aporte significativo al

conocimiento de las cepas circulantes en el ganado bovino de nuestro país y a los estudios de epidemiología molecular de la DVB.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H. J., & Becher, P. (2001). Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, 286(2), 456–465.

Bauermann, F. V., Falkenberg, S. M., & Ridpath, J. F. (2016). HoBi-Like Virus RNA Detected in Foetuses Following Challenge of Pregnant Cows that had Previously Given Birth to Calves Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5), 1624–1632.

Bauermann, F. V., & Ridpath, J. F. (2015). HoBi-like viruses – the typical “atypical bovine pestivirus.” *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 16(01), 64–69.

Bauermann, F. V., Falkenberg, S. M., Vander Ley, B., Decaro, N., Brodersen, B. W., Harmon, A., ... Ridpath, J. F. (2014a). Generation of Calves Persistently Infected with HoBi-Like Pestivirus and Comparison of Methods for Detection of These Persistent Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), 3845–3852.

Bauermann, F. V., Flores, E. F., Falkenberg, S. M., Weiblen, R., & Ridpath, J. F. (2014b). Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 26(1), 10–17.

Bauermann, F. V., Ridpath, J. F., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2013a). HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 25(1), 6–15.

Bauermann, F. V., Harmon, A., Flores, E. F., Falkenberg S. M., Reecy, J. M., Ridpath, J. F., (2013b). In vitro neutralization of HoBi-like viruses by antibodies in serum of cattle immunized with inactivated or modified live vaccines of bovine viral diarrhea viruses 1 and 2. *Veterinary Microbiology*, 166, 242–245.

Bauermann, F. V., Flores, E. F., & Ridpath, J. F. (2012). Antigenic relationships between Bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 24(2), 253–261.

- Becher, P., Orlich, M., König, M., & Thiel, H. J. (1999). Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhoea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *Journal of Virology*, 73(7), 5646–5653.
- Becher, P., Shannon, A. D., Tautz, N., & Thiel, H. J. (1994). Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology*, 198(2), 542–551.
- Bianchi, E., Martins, M., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2011). Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). *Pesquisa Veterinária Brasileira: Revista Do Colegio Brasileiro de Patologia Animal = Brazilian Journal of Veterinary Research*, 31(8), 649–655.
- Bielefeldt- Ohmann, H. (1988). In situ characterization of mononuclear leukocytes in skin and digestive tract of persistently bovine viral diarrhoea virus-infected clinically healthy calves and calves with mucosal disease. *Veterinary Pathology*, 25(4), 304–309.
- Bolin, S. R., & Grooms, D. L. (2004). Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 20(1), 51–68.
- Bolin, S. R., & Ridpath, J. F. (1996). Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease. *Archives of Virology*, 141(8), 1463–1477.
- Brock, K. V., Deng, R., & Riblet, S. M. (1992). Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR. *Journal of Virological Methods*, 38(1), 39–46.
- Brownlie, J., Clarke, M., & Howard, C. (1989). Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci*, 46, 307- 311.
- Brownlie, J., Clarke, M., Howard, C. J., & Pocock, D., H. (1987). Pathogenesis and epidemiology of bovine viral diarrhoea virus – infection of cattle. *Ann Rech Vet* 18(2), 157-166.
- Brownlie, J., Clarke, M., & Howard, C. (1984). Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *The Veterinary Record*, 114(22), 535–536.
- Carman, S., van Dreumel, T., Ridpath, J., Hazlett, M., Alves, D., Dubovi, E., ... Anderson, N. (1998). Severe Acute Bovine Viral Diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 10(1), 27–35.
- César D. (1996). Detección del virus de la Diarrea Viral Bovina en Uruguay. XXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. 13-15, junio, Paysandú, Uruguay, P- 11.

Charleston, B., Fray, M. D., Baigent, S., Carr, B.V., Morrison, W.I. (2001). Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol*, 82(8), 1893-1897.

Chernick, A., Godson, D. L., & van der Meer, F. (2014). Metadata beyond the sequence enables the phylodynamic inference of bovine viral diarrhea virus type 1a isolates from Western Canada. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 28, 367–374.

Childs, T. (1946). X Disease of Cattle - Saskatchewan. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 10(11), 316–319.

Coggins, L., Gillespie, J. H., Robson, D. S., Thompson, J. D., Phillips, W. V., Wagner, W. C., & Baker, J. A. (1961). Attenuation of virus diarrhea virus (strain Oregon C24V) for vaccine purposes. *The Cornell Veterinarian*, 51, 539–545.

Collett, M. S., Larson, R., Belzer, S. K., & Retzel, E. (1988a). Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology*, 165(1), 200–208.

Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K., & Purchio, A. F. (1988b). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology*, 165(1), 191–199.

Corapi, W. V., Elliott, R. D., French, T.W., Arthur, D.G., Bezek, D.M., Dubovi, E.J. (1990) Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. *J Am Vet Med Assoc.*, 196(4), 590-596.

Cortez, A., Araújo, J. P., Jr, Flores, E. F., Ribeiro, M. G., Megid, J., Paes, A. C., ... Heinemann, M. B. (2017). Complete Genome Sequence of a Hobi-Like Virus Isolated from a Nelore Cow with Gastroenteric Disease in the State of São Paulo, Brazil. *Genome Announcements*, 5(33), 1-2.

Cortez, A., Heinemann, M. B., de Castro, A. M. M. G., Soares, R. M., Pinto, A. M. V., Alfieri, A. A., ... Richtzenhain, L. J. (2006). Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pesquisa Veterinaria Brasileira: Revista Do Colegio Brasileiro de Patologia Animal = Brazilian Journal of Veterinary Research*, 26(4), 211–216.

Decaro, N., Lanave, G., Lucente, M. S., Mari, V., Varello, K., Losurdo, M., ... Buonavoglia, C. (2014). Mucosal Disease-Like Syndrome in a Calf Persistently Infected by Hobi-Like Pestivirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8), 2946–2954.

Decaro, N., Losurdo, M., Lucente, M. S., Sciarretta, R., Mari, V., Larocca, V., ... Buonavoglia, C. (2013). Persistent infection caused by Hobi-like pestivirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4), 1241–1243.

- Decaro, N., Lucente, M. S., Mari, V., Sciarretta, R., Pinto, P., Buonavoglia, D., ... Buonavoglia, C. (2012). Hobi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2), 509–512.
- Decaro, N., Lucente, M. S., Mari, V., Cirone, F., Cordioli, P., Camero, M., ... Buonavoglia, C. (2011). Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 17(8), 1549–1552.
- Deng, M., Ji, S., Fei, W., Raza, S., He, C., Chen, Y., ... Guo, A. (2015). Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in four bovine species in China. *PloS One*, 10(4), 1-16.
- Deng, R., & Brock, K. V. (1993). 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Research*, 21(8), 1949–1957.
- Donis, R. O. (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 11(3), 393–423.
- Donis, R. O., & Dubovi, E. J. (1987). Characterization of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *The Journal of General Virology*, 68 (Pt 6), 1597–1605.
- Dubovi, E. J. (1994). Impact of Bovine Viral Diarrhea Virus on Reproductive Performance in Cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 10(3), 503–514.
- Easton C. (2006). Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo, Uruguay.
- Fenner, F. (1976). Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, 7(1-2), 1–115.
- Firth, C., Bhat, M., Firth, M. A., Williams, S. H., Frye, M. J., Simmonds, P., ... Lipkin, W. I. (2014). Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *mBio*, 5(5), 1-16.
- 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.
- Francki, R., Fauquet, C.M., Knudson, D., et al. (1991). The fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Springer Verlag.
- Gao, S., Du, J., Tian, Z., Xing, S., Chang, H., Liu, G., ... Yin, H. (2016). Genome analysis of an atypical bovine pestivirus from fetal bovine serum. *Virus Genes*, 52(4), 561–563.

- Gao, S., Luo, J., Du, J., Lang, Y., Cong, G.,Yin, H. (2013). Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus in Western China. *Veterinary Microbiology*, 163, 172-176.
- Giammarioli, M., Ridpath, J. F., Rossi, E., Bazzucchi, M., Casciari, C., & De Mia, G. M. (2015). Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 43(4), 220–224.
- Giangaspero, M., Harasawa, R., Weber, L., & Belloli, A. (2008). Genoepidemiological evaluation of Bovine viral diarrhoea virus 2 species based on secondary structures in the 5' untranslated region. *J Vet Med Sci.*, 70(6), 571-580.
- Gillespies, J., Baker, J., & McEntee, K. (1960). A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet*, 50, 73-79.
- Gollán, A., Chimeno Zoth, S. A., Piccone, M. E., Mariño, B., Peralta, C., Rodríguez 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.
- Goyal, S.M. (2005) Diagnosis. En: Goyal, S. M., Ridpath, J. F. (2005) *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management, and Control*. Ed. Blackwell Publishing Ltd. 1a ed. Victoria, Cap.12, pp.197-208.
- Guarino H, Saizar J, Kaku Y, Inui K (2000). Genetic typing of Bovine Pestiviruses in Uruguay. XXI Congreso Mundial de Buiatria. 4-8, diciembre, Punta del Este, Uruguay,P-88.
- Hafez, S.M., & Liess, B. (1972). Studies on bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. II. Stability and some physico-chemical properties. *Acta Virol*, 16, 399-408.
- Haider, N., Rahman, M. S., Khan, S. U., Mikolon, A., Gurley, E. S., Osmani, M. G., ... Rahman, M. Z. (2014). Identification and epidemiology of a rare HoBi-like pestivirus strain in Bangladesh. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(3), 193–198.
- Hamers, C., Dehan, P., Couvreur, B., Letellier, C., Kerkhofs, P., & Pastoret, P.-P. (2001). Diversity Among Bovine Pestiviruses. *The Veterinary Journal*, 161(2), 112–122.
- Hause, B. M., Collin, E. A., Peddireddi, L., Yuan, F., Chen, Z., Hesse, R. A., ... Anderson, G. (2015). Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *The Journal of General Virology*, 96(10), 2994–2998.
- Heinz, F. X., Collett, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Howard, C. R., Houghton, M., Moormann, R. J. M., Rice, C. M., & Thiel, H.-J. (2000). Genus Pestivirus. In “*Virus Taxonomy*”. Eds. Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Nishop, D. H. L.,... et al., pp. 867–872. Academic Press, New York.

Hermodsson, S., & Dinter, Z. (1962). Properties of bovine viral diarrhoea virus. *Nature*, 483(2), 893-894.

Horner, G. (1995). Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription - polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Veterinary Microbiology*, 43(1), 75–84.

Houe, H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, 64(2-3), 89–107.

Houe, H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 31(2), 137–143.

Howard, C. J., Clarke, M. C., Sopp, P., & Brownlie, J. (1992). Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 32(3-4), 303–314.

Jackova, A., Novackova, M., Pelletier, C., Audeval, C., Gueneau, E., Haffar, A., ... Vilcek, S. (2008). The extended genetic diversity of BVDV-1: typing of BVDV isolates from France. *Veterinary Research Communications*, 32(1), 7–11.

Jenckel, M., Höper, D., Schirrmeier, H., Reimann, I., Goller, K. V., Hoffmann, B., & Beer, M. (2014). Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus detected by deep sequencing. *Journal of Virology*, 88(12), 6983–6992.

Jones, L. R., & Weber, E. L. (2004). Homologous recombination in bovine pestiviruses. Phylogenetic and statistic evidence. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 4(4), 335–343.

Jones, L. R., Zandomeni, R., & Weber, E. L. (2001). Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Veterinary Microbiology*, 81(4), 367–375.

Kadir, Y., Christine, F., Barbara, B.-W., Zeki, Y., Feray, A., Aykut, O., ... Matthias, K. (2008). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a new subgroup in BVDV-1. *Veterinary Microbiology*, 130(3-4), 258–267.

Kirkland, P. D., Frost, M. J., Finlaison, D. S., King, K. R., Ridpath, J. F., & Gu, X. (2007). Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. *Virus Research*, 129(1), 26–34.

Kóvágó, C., Hornyák, Á., Kékesi, V., & Rusvai, M. (2016). Demonstration of homologous recombination events in the evolution of bovine viral diarrhoea virus by in silico investigations. *Acta Veterinaria Hungarica*, 64(3), 401–414.

- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.
- Kümmerer, B. M., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H., & Meyers, G. (2000). The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Veterinary Microbiology*, 77(1-2), 117–128.
- Lamp, B., Schwarz, L., Högler, S., Riedel, C., Sinn, L., Rebel-Bauder, B., ... Rümenapf, T. (2017). Novel Pestivirus Species in Pigs, Austria, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 23(7), 1176–1179.
- Lee, K. M., & Gillespie, J. H. (1957). Propagation of Virus Diarrhea Virus of Cattle in Tissue Culture. *Am J Vet Res*, 18, 952-953.
- Liebler-Tenorio, E. M. (2005) Pathogenesis. En: Goyal, S. M., Ridpath, J. F. (2005) *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control*. Ed. Blackwell Publishing Ltd. 1a ed. Victoria, Cap. 7, pp. 121–143.
- Liess, B. (1990) Bovine Viral Diarrhea Virus. En: Dinter, Z. & Morein, B. (1990) *Virus Infections of Ruminants*. Ed. Elsevier Science Publishers, Uppsala, Cap. 23, pp. 247–266.
- Lindenbach, B.D., Rice, CH.M. (2007) Flaviviridae: The viruses and their replication. En: Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007) *Fields' Virology*. Ed. Lippincott Williams & Wilkins 5^a ed. Philadelphia, vol 1, cap. 33, pp. 1101-1152.
- Liu, L., Larska, M., Xia, H., Uttenthal, A., Polak, M. P., Ståhl, K., ... Belák, S. (2012). Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 18(11), 1917–1918.
- Liu, L., Xia, H., Belák, S., & Baule, C. (2009a). Maximum likelihood and Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic characterization of a novel pestivirus, SVA/cont-08. *Arch Virol*, 154, 1111-1116.
- Liu, L., Xia, H., Wahlberg, N., Belák, S., & Baule, C. (2009b). Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*, 385(2), 351–357.
- Luzzago, C., Ebranati, E., Sasserà, D., Lo Presti, A., Lauzi, S., Gabanelli, E., ... Zehender, G. (2012). Spatial and temporal reconstruction of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 dispersion in Italy. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(2), 324–331.
- Mao, L., Li, W., Zhang, W., Yang, L., & Jiang, J. (2012). Genome sequence of a novel Hobi-like pestivirus in China. *Journal of Virology*, 86(22), 12444.

- Maya, L., Puentes, R., Reolón, E., Acuña, P., Riet, F., Rivero, R., ... Colina, R. (2016). Molecular diversity of bovine viral diarrhea virus in Uruguay. *Archives of Virology*, 161(3), 529–535.
- Mederos A, Hirigoyen D (1998). Relevamiento epidemiológico de diarrea viral bovina; Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y Leucosis Bovina en predios lecheros del noreste de Uruguay. XXVI Jornadas Uruguayas de Buiatria. 18-20, junio, Paysandú, Uruguay, P- 19.
- Meyers, G., Tautz, N., Stark, R., Brownlie, J., Dubovi, E. J., Collett, M. S., & Thiel, H. J. (1992). Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*, 191(1), 368–386.
- Meyers, G., Rumenapft, T., Tautz, N., Dubovi, E. J., & Thiel, H. J. (1991). Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol*, 3, 133-142.
- Miekka, S. I., Busby, T. F., Reid, B., Pollock, R., Ralston, A., & Drohan, W. N. (1998). New methods for inactivation of lipid-enveloped and non-enveloped viruses. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 4(4), 402–408.
- Mishra, N., Rajukumar, K., Pateriya, A., Kumar, M., Dubey, P., Behera, S. P., ... Reddy, N. D. (2014). Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Veterinary Microbiology*, 174(1-2), 239–246.
- Moennig, V., Plagemann, P. G. (1992). Review: The pestiviruses. *Adv Virus Res*, 41, 53-98.
- Mósená, A. C. S., Cibulski, S. P., Weber, M. N., Silveira, S., Silva, M. S., Mayer, F. Q., ... Canal, C. W. (2017a). Genomic and antigenic relationships between two “HoBi”-like strains and other members of the Pestivirus genus. *Archives of Virology*, 162(10), 3025–3034.
- Mósená, A. C. S., Weber, M. N., Cibulski, S. P., Silveira, S., Silva, M. S., Mayer, F. Q., & Canal, C. W. (2017b). Genomic characterization of a bovine viral diarrhea virus subtype 1i in Brazil. *Archives of Virology*, 162(4), 1119–1123.
- Nagai, M., Hayashi, M., Itou, M., Fukutomi, T., Akashi, H., Kida, H., & Sakoda, Y. (2008). Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes*, 36(1), 135–139.
- Odeón, A. C., Risatti, G., Kaiser, G. G., Leunda, M. R., Odriozola, E., Campero, C. M., & Donis, R. O. (2003). Bovine viral diarrhea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Veterinary Microbiology*, 96(2), 133–144.
- Oguzoglu, T. C., Tan, M. T., Toplu, N., Demir, A. B., Bilge-Dagalp, S., Karaoglu, T., ... Greiser-Wilke, I. (2009). Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup? *Veterinary Microbiology*, 135(3-4), 374–379.

- Olafson, P., MacCALLUM, A. D., & Fox, F. H. (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *The Cornell Veterinarian*, 36, 205–213.
- Pecora, A., Malacari, D. A., Ridpath, J. F., Perez Aguirreburualde, M. S., Combessies, G., Odeón, A. C., ... Wigdorovitz, A. (2014). First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Research in Veterinary Science*, 96(1), 204–212.
- Pecora, A., Pérez Aguirreburualde, M. S., Malacari, D. A., Zabal, O., Sala, J. M., Konrad, J. L., ... Dus Santos, M. J. (2017). Serologic evidence of HoBi-like virus circulation in Argentinean water buffalo. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 29(6), 926–929.
- Peletto, S., Zuccon, F., Pitti, M., Gobbi, E., Marco, L. D., Caramelli, M., ... Acutis, P. L. (2012). Detection and phylogenetic analysis of an atypical pestivirus, strain IZSPLV_To. *Research in Veterinary Science*, 92(1), 147–150.
- Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J., & Tijssen, P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 203(2), 260–268.
- Pestova, T. V., & Hellen, C. U. (1999). Internal initiation of translation of bovine viral diarrhea virus RNA. *Virology*, 258(2), 249–256.
- Peterhans, E., Bachofen, C., Stalder, H., & Schweizer, M. (2010). Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary Research*, 41(6), 44.
- Peterhans, E., Jungi, T. W., & Schweizer, M. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 31(2), 107–112.
- 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.
- Ramsey, F. K., & Chivers, W. H. (1957). Symposium on the mucosal disease complex. II. Pathology of a Mucosal Disease of Cattle. *J Am Vet Med Assoc.*, 130(9):381-3.
- Repiso M, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernandez L, Guarino H, Herrera B, Nuñez A, Olivera M, Osawa T, Silva M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Vet* 40: 5-28.
- Ridpath, J. F. (2010). Bovine viral diarrhea virus: global status. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 26(1), 105–121.

- Ridpath, J. F., Neill, J. D., Vilcek, S., Dubovi, E. J., & Carman, S. (2006). Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4), 196–204.
- Ridpath, J. F. (2003). BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 31(2), 127–131.
- 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.
- Ridpath, J. F., & Bolin, S. R. (1995). Delayed Onset Postvaccinal Mucosal Disease as a Result of Genetic Recombination between Genotype 1 and Genotype 2 BVDV. *Virology*, 212(1), 259–262.
- Ridpath, J. F., Bolin, S. R., & Dubovi, E. J. (1994). Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*, 205(1), 66–74.
- Saizar J, Gil A. (1998). Estudio serológico de la Diarrea Viral Bovina en bovinos en el Uruguay. *Vet* 34: 9-14.
- Saliki, J. T., Huchzermeier, R., & Dubovi, E. J. (2000). Evaluation of a new sandwich ELISA kit that uses serum for detection of cattle persistently infected with BVD virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916, 358–363.
- Schirmer, 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. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 12), 3647–3652.
- Silveira, S., Baumbach, L. F., Weber, M. N., Mósena, A. C. S., da Silva, M. S., Cibulski, S. P., ... Canal, C. W. (2017). HoBi-like is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(1), e113–e120.
- Silveira, S., Weber, M. N., Mósena, A. C. S., da Silva, M. S., Streck, A. F., Pescador, C. A., ... Canal, C. W. (2015). Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(2), 613–623.
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., ... Ictv Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, 98(1), 2–3.
- Smith, D. B., Meyers, G., Bukh, J., Gould, E. A., Monath, T., Scott Muerhoff, A., ... Becher, P. (2017). Proposed revision to the taxonomy of the genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae*. *The Journal of General Virology*, 98(8), 2106–2112.
- Stahl, K., Kampa, J., Alenius, S., Persson, A., Baule, C., Aiumlamai, S., Belák, S. (2007).

Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus – Implications for BVD control and for the safety of biological products. *Vet. Res.*, 38, 517–523.

Stalder, H. P., Meier, P., Pfaffen, G., Wageck-Canal, C., Rüfenacht, J., Schaller, P., ... Peterhans, E. (2005). Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1-2), 37–41; discussion 215–219.

Tajima, M. (2004). Bovine viral diarrhoea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. *Veterinary Microbiology*, 99(2), 131–138.

Thiel, H. J., Collett, M. S., Gould, E. A., et al. (2005). Family Flaviviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M. A., Maniloff, J., et al, editors. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego (CA): Elsevier Academic Press, 981- 9980-9912-249951-249954.

Vilcek, S., Ridpath, J. F., Van Campen, H., Cavender, J. L., & Warg, J. (2005). Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Research*, 108(1-2), 187–193.

Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesárová, M., Greiser-Wilke, I., & Paton, D. (2004). Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Veterinary Research*, 35(5), 609–615.

Vilček, Š., Paton, D. J., Durkovic, B., Strojny, L., Ibata, G., Moussa, A., ... 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.

Vilcek, 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.

Weber, M. N., Streck, A. F., Silveira, S., Mósena, A. C. S., da Silva, M. S., & Canal, C. W. (2015). Homologous recombination in pestiviruses: Identification of three putative novel events between different subtypes/genogroups. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 30, 219–224.

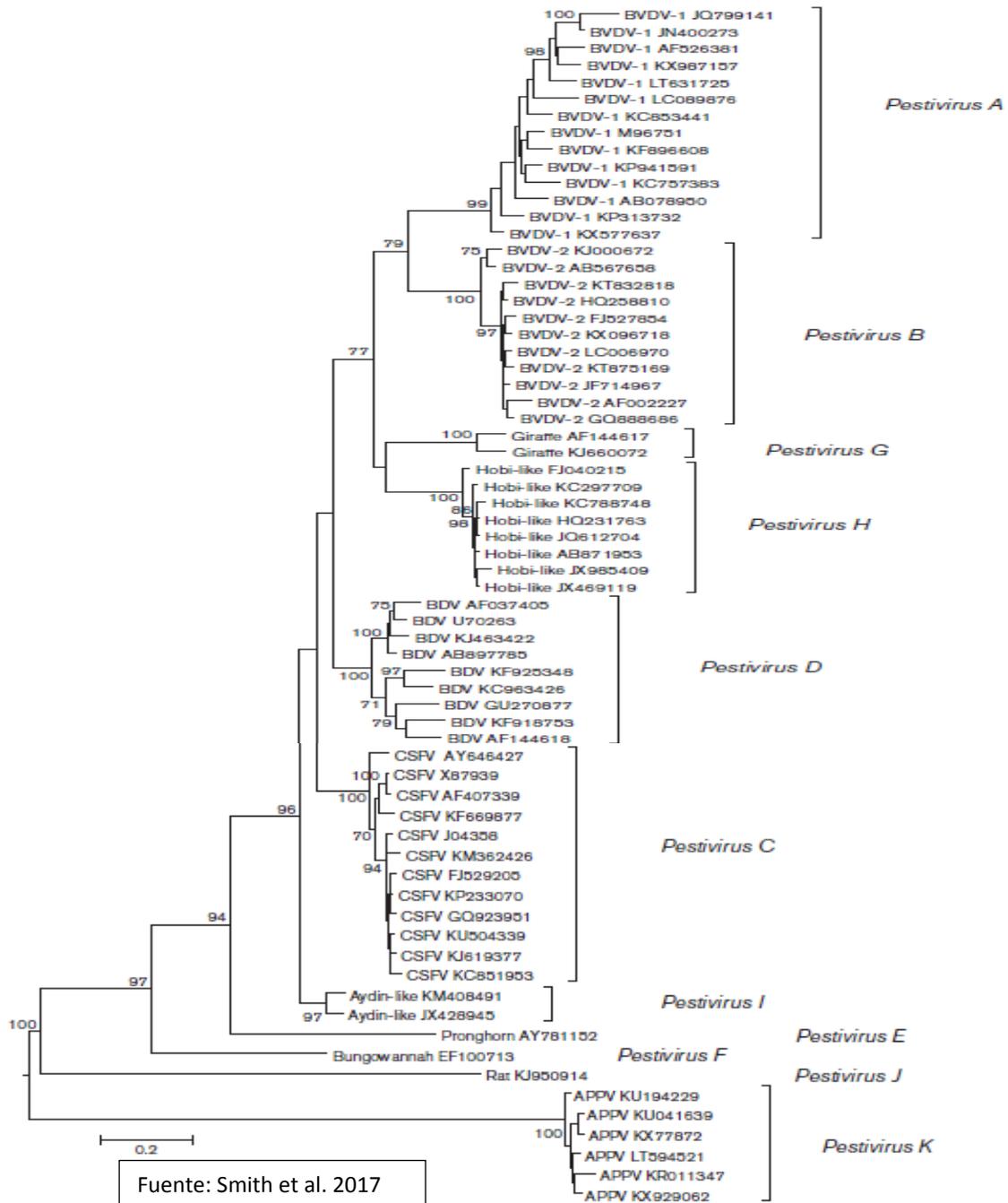
Weber, M. N., Mósena, A. C. S., Simões, S. V. D., Almeida, L. L., Pessoa, C. R. M., Budaszewski, R. F., ... Canal, C. W. (2014a). Clinical Presentation Resembling Mucosal Disease Associated with "HoBi"-like Pestivirus in a Field Outbreak. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(1), 92–100.

Weber, M. N., Silveira, S., Machado, G., Groff, F. H. S., Mósena, A.C.S, Budaszewskia, R. F. Duponta P. M., Corbellinib L. G., Canala C. W. (2014b). High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Research*, 191, 117-124.

- Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., ... Jin, Q. (2012). Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *Journal of Virology*, 86(20), 10999–11012.
- Xia, H., Larska, M., Giammarioli, M., De Mia, G. M., Cardeti, G., Zhou, W., ... Liu, L. (2013). Genetic detection and characterization of atypical bovine pestiviruses in foetal bovine sera claimed to be of Australian origin. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(3), 284–288.
- Xia, H., Vijayaraghavan, B., Belák, S., & Liu, L. (2011). Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *PloS One*, 6(12), 1–3.
- Xia, H., Liu, L., Wahlberg, N., Baule, C., & Belák, S. (2007). Molecular phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus: a Bayesian approach. *Virus Research*, 130(1-2), 53–62.
- Xue, F., Zhu, Y.-M., Li, J., Zhu, L.-C., Ren, X.-G., Feng, J.-K., ... Gao, Y.-R. (2010). Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China between 2005 and 2008. *Veterinary Microbiology*, 143(2-4), 379–383.
- Yeşilbağ, K., Alpay, G., & Becher, P. (2017). Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Viruses*, 9(6), 1-19.
- Yeşilbağ, K., Förster, C., Ozyiğit, M. O., Alpay, G., Tuncer, P., Thiel, H.-J., & König, M. (2014). Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Veterinary Microbiology*, 169(1-2), 42–49.
- Zimmer, G. M., Van Maanen, C., De Goey, I., Brinkhof, J., & Wentink, G. H. (2004). The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples. *Veterinary Microbiology*, 100(3-4), 145–149.

9 ANEXO

9.1 ANEXO I: TAXONOMÍA PROPUESTA PARA LOS *Pestivirus*.



9.2 ANEXO II: LISTA DE REACTIVOS UTILIZADOS

a	HerdChek BVDV ag/ Serum, IDEXX Laboratories, Bern, Switzerland.
b	Bovine Viral Diarrhea Virus Antigens Test Kit, ELISA. Biovet Inc, St. Hyacinthe (Qc) Canadá.
c	QIAamp Viral ARN Mini kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany.

d	SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA.
e	OneStep RT-PCR kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany.
f	SS III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA.
g	Buffer Electrophoresis 50X TAE, Thermo Scientific, Lithuania.
h	SYBR™ Safe DNA Gel Stain, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA.
i	GeneRuler 100 pb, Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, Lithuania.
j	QIAquick Gel Extraction kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany



4/17



ACTA DE EXAMEN

CURSO Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA Montevideo, 13 de abril de 2018

TRIBUNAL: Dra. Silvia Llambi (Presidente), Dr. Juan Arbiza, Dr. Álvaro Núñez

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
3.440.482-0	GUEDES ALVEZ, Kelly Rosario	S.S.S	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dra. Silvia Llambi (Presidente)

Dr. Juan Arbiza

Dr. Álvaro Núñez

FIRMA

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser: B.B.B. - 6 , o S.S.S. - 12