



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Laboratorio de Virología Animal
Área de Producción Animal-EEA INTA Balcarce

Tesis para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
área Ciencias Veterinarias

**Comparación de métodos para el diagnóstico y estudio del virus de
la diarrea viral bovina en muestras de sueros, fetos y neonatos
bovinos**

Méd. Vet. Maximiliano Joaquín Spetter

Director: Dr. Anselmo Carlos Odeón

Codirectora: Dra. Alejandra Victoria Capozzo

2021

Este trabajo fue realizado con fondos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, a través del Proyecto PICT *Start Up* 2014-0308; del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, a través del Proyecto Específico PNSA1115053 y con fondos del Laboratorio de Virología Animal (INTeA S.A.) de la EEA INTA Balcarce.

AGRADECIMIENTOS

*“La gratitud en silencio no sirve a nadie”
Gladys Berthe Stern*

- A Anselmo por su guía, por sus claras explicaciones que comenzaban con un “Básicamente..” y por los muchos “No te disperses...”
- A Alejandra por su apoyo y colaboración para enriquecer este trabajo
- A Erika y Quique, mis “directores encubiertos”, por los cables a tierra y las largas horas de sueros y debates
- A Andrea por dejarme participar en sus trabajos y por permitirme ser su sicólogo...ahora yo necesito uno...
- A Susy y María Rosa por recibirme abiertamente y compartir sus conocimientos y experiencias
- A Franco y Nacho por los “Vamos a fumar un puchito...”, charlas en las que acomodamos el país y la ciencia en más de una oportunidad
- Al “Riguroso” Armendano por aportar su magia con la estadística
- A los amigos y amigas del “Chinchorro” y “La peña de Becarios Pobres” por las charlas con mate de por medio y alguna que otra cerveza
- A los “Neosporitas” por el invaluable intercambio académico y no tan académico
- A todos los amigos y colegas que, directa o indirectamente participaron en esta etapa
- A Miryam por su valioso aporte en la aplicación de la técnica FAL-ELISA
- A la Escuela de Graduados y Comisión de Doctorado de la UBA por responder a cada una de mis inquietudes
- A las Evaluadoras por su tiempo y conocimiento que mejoraron la calidad de este trabajo
- A mis viejos por bancarme siempre

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Spetter MJ, Louge Uriarte EL, Verna A, Pereyra S, Leunda MR, Odeón A, González Altamiranda EA. Genomic diversity and phylodynamic of bovine viral diarrhea virus in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution.* 96: 105089. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105089> (Sección 4)

Spetter MJ, Louge Uriarte EL, Armendano JI, Álvarez I, Norero NS, Storani L, Pereyra S, Verna A, Odeón A, González Altamiranda EA (2020) Frequency of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in Argentinean bovine herds and comparison of diagnostic tests for BVDV detection in bovine serum samples: a preliminary study. *Brazilian Journal of Microbiology.* 52: 467-475. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00410-1> (Secciones 1 y 2)

Spetter MJ, Louge Uriarte EL, Armendano JI, Morrel EL, Cantón GJ, Verna AE, Dorsch MA, Leunda MR, Pereyra SB, Odeón AC, Saliki JT; González Altamiranda EA (2020) Detection methods and characterization of bovine viral diarrhea virus in aborted fetuses, stillbirths and calves over a 22-year period. *Brazilian Journal of Microbiology,* 51: 2077-2086. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00296-z> (Sección 3)

Spetter MJ, Louge Uriarte EL, González Altamiranda EA, Leunda MR, Pereyra SB, Verna AE, Odeón AC (2018) Dual natural infection with bovine viral diarrhea virus (BVDV)-1 and BVDV-2 in a stillborn calf: tissue distribution and molecular characterization. *Open Veterinary Journal,* 8: 493-497. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i4.23> (Sección 1)

Odeón AC, González Altamiranda E, Goizueta M, Verna A, Louge Uriarte E, Spetter M, Späth E, Castellano A, Odriozola E, Cantón G, Fernández J, Finelli J, Pereyra S, Leunda MR, Recalt V, Capozzo A, Malacari D (2016) Valorización económica de la implementación de una estrategia sanitaria de control del virus de la Diarrea Viral Bovina en un establecimiento de cría. *Anales ANAV,* 169: 1-11. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/66942> (Sección 1)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
SUMMARY	xi
INTRODUCCIÓN	1
Aspectos generales del virus de la diarrea viral bovina	1
Descripción del virus de la diarrea viral bovina	1
Transmisión y epidemiología	2
Presentación clínica	3
Métodos de diagnóstico del virus de la diarrea viral bovina	4
Detección del virus	5
Aislamiento viral	6
Inmunohistoquímica - inmunofluorescencia	6
ELISA para detección de antígeno	7
RT-PCR	8
Detección de anticuerpos	8
Seroneutralización viral	9
ELISA para detección de anticuerpos	9
Métodos de diagnóstico en programas de control del virus de la diarrea viral bovina	10
Métodos de diagnóstico de abortos por el virus de la diarrea viral bovina	14
Filogenia y filodinamia del virus de la diarrea viral bovina	15
Consideraciones finales	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIALES y MÉTODOS	19
SECCIÓN 1: Adaptación de la técnica RT-PCR anidada y múltiple a las condiciones y sistema del laboratorio de trabajo para la detección del VDVB en sueros y muestras fetales	19
Oligonucleótidos	19
Muestras de suero	19
Puesta a punto y optimización de la RT-PCR anidada y múltiple	20
Comparación de un método de extracción de ARN y de tratamiento térmico sin extracción de ARN en muestras de suero	21

Sensibilidad analítica, especificidad analítica y efecto de la conformación de <i>pools</i> de sueros	23
Detección del VDVB en programas de saneamiento y casos de diagnóstico	23
Muestras fetales.....	24
SECCIÓN 2: Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada, RT-PCR en tiempo real y ELISA luminométrico asistido por filtración para la detección del VDVB en muestras de suero bovino	26
Pruebas diagnósticas.....	26
Aislamiento viral	26
ELISA luminométrico asistido por filtración.....	26
RT-PCR anidada y múltiple	28
RT-PCR en tiempo real	28
SECCIÓN 3: Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada, RT-PCR en tiempo real y ELISA de captura de antígeno para la detección del VDVB en muestras de fetos abortados y neonatos bovinos	30
Pruebas diagnósticas.....	30
Aislamiento viral	30
ELISA de captura de antígeno.....	30
RT-PCR anidada y múltiple	31
RT-PCR en tiempo real	31
Hallazgos patológicos	31
Evaluación de la seroneutralización viral frente a los subtipos -1a, -1b y -2b del VDVB en fluidos fetales	31
SECCIÓN 4: Caracterización genotípica de las cepas del VDVB identificadas durante el estudio.....	33
RT-PCR para la región 5'UTR del genoma del VDVB.....	33
Secuenciación y análisis filogenético	33
Identidades por pares de las secuencias nucleotídicas del fragmento 5'UTR.....	34
Análisis filodinámico del fragmento 5'UTR.....	34
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	37
RESULTADOS	38
SECCIÓN 1: Adaptación de la técnica RT-PCR anidada a las condiciones y sistema del laboratorio de trabajo para la detección del VDVB en sueros y muestras fetales.....	38
Puesta a punto y adaptación de la RT-PCR anidada y múltiple.....	38
Sensibilidad analítica, especificidad analítica y efecto de la conformación de <i>pools</i> de sueros	38

Detección del virus de la diarrea viral bovina en programas de saneamiento y casos de diagnóstico.....	38
Muestras fetales.....	40
SECCIÓN 2: Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada, RT-PCR en tiempo real y ELISA luminométrico asistido por filtración para la detección del VDVB en muestras de suero bovino	41
SECCIÓN 3: Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada, RT-PCR en tiempo real y ELISA de captura de antígeno para la detección del VDVB en muestras de fetos abortados y neonatos bovinos	45
Hallazgos patológicos	49
Evaluación de la seroneutralización viral frente a los subtipos -1a, -1b y -2b del VDVB en fluidos fetales	50
SECCIÓN 4: Caracterización genotípica de las cepas del VDVB identificadas durante el estudio	52
Análisis filodinámico del fragmento 5´UTR.....	54
DISCUSIÓN	58
SECCIÓN 1: Adaptación de la técnica RT-PCR anidada y múltiple a las condiciones y sistema del laboratorio de trabajo para la detección del VDVB en sueros y muestras fetales.....	59
Sensibilidad analítica, especificidad analítica y efecto de la conformación de pools de sueros	60
Detección del virus de la diarrea viral bovina en programas de saneamiento y casos de diagnóstico.....	62
Muestras fetales.....	66
SECCIÓN 2: Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada y múltiple, RT-PCR en tiempo real y ELISA luminométrico asistido por filtración para la detección del VDVB en muestras de suero bovino.....	68
SECCIÓN 3: Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada, RT-PCR en tiempo real y ELISA de captura de antígeno para la detección del VDVB en muestras de fetos abortados y neonatos bovinos	72
SECCIÓN 4: Caracterización genotípica de las cepas del VDVB identificadas durante el estudio	80
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFÍA	87
ANEXO	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Métodos disponibles para el diagnóstico del virus de la diarrea viral bovina según el objetivo establecido.....	5
Tabla 2: Métodos de diagnóstico para la detección del virus de la diarrea viral bovina en programas de saneamiento.....	12
Tabla 3: Combinaciones de ADN complementario y producto de la primera ronda de PCR.....	20
Tabla 4: Cuantificación de ARN y relación 260/280 en bazo, pulmón y cerebro de dos fetos abortados y dos neonatos bovinos.....	24
Tabla 5: Detección del virus de la diarrea viral bovina en <i>pools</i> y muestras individuales de suero bovino por RT-nPCR.....	39
Tabla 6: Sueros bovinos positivos al virus de la diarrea viral bovina.....	41
Tabla 7: Proporción de sueros bovinos positivos al virus de la diarrea viral bovina según la técnica empleada.....	43
Tabla 8: Sensibilidad y especificidad de las técnicas FAL-ELISA, RT-nPCR y RT-qPCR para la detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de sueros bovinos considerando al AV como prueba de referencia.....	43
Tabla 9: Porcentaje de acuerdo y concordancia entre AV, FAL-ELISA, RT-nPCR y RT-qPCR para la detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de sueros bovinos.....	44
Tabla 10: Muestras de fetos abortados y neonatos bovino positivas al virus de la diarrea viral bovina.....	46
Tabla 11: Proporción de fetos abortados y neonatos bovinos positivos al virus de la diarrea viral bovina según la técnica empleada.....	47
Tabla 12: Sensibilidad y especificidad de las técnicas ELISAag, RT-nPCR y RT-qPCR para la detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de fetos abortados y neonatos bovinos considerando al AV como prueba de referencia.....	48
Tabla 13: Porcentaje de acuerdo y concordancia entre AV, ELISAag, RT-nPCR y RT-qPCR para la detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de fetos abortados y neonatos bovinos.....	48
Tabla 14: Frecuencia, severidad y principales lesiones microscópicas en órganos de casos de fetos abortados y neonatos bovinos positivos a la detección del virus de la diarrea viral bovina.....	50
Tabla 15: Estimaciones de la edad del ancestro común más reciente y tasa de sustitución del fragmento 5'UTR del virus de la diarrea viral -1a y -1b.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tipificación del virus de la diarrea viral bovina por RT-PCR anidada y múltiple	21
Figura 2: RT-PCR anidada y múltiple para la detección del virus de la diarrea viral bovina en tejidos de dos fetos abortados y dos neonatos bovinos infectados naturalmente	25
Figura 3: Evaluación de lisados de infección de células MDBK en NS3-ELISA y FAL-ELISA corregidas respecto del blanco.....	27
Figura 4: Evaluación de muestras positivas y negativas de sueros bovinos con FAL-ELISA	28
Figura 5: Distribución espacial de los establecimientos muestreados para la detección del virus de la diarrea viral bovina por RT-nPCR en suero.....	40
Figura 6: Distribución espacial de los establecimientos con casos de aborto/mortalidad positivos al virus de la diarrea viral bovina por RT-nPCR	45
Figura 7: Porcentaje de casos según la respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a los subtipos -1a, -1b y -2b del virus de la diarrea viral bovina en fluidos de cavidad de fetos abortados y neonatos bovinos.....	51
Figura 8: Árboles filogenéticos reconstruidos con secuencias de la región 5'UTR y NS5B del virus de la diarrea viral bovina	53
Figura 9: Comparación de mapeo de verosimilitud de los conjuntos de secuencias del fragmento 5'UTR del virus de la diarrea viral -1a y -1b.....	54
Figura 10: Árboles filogenéticos del fragmento 5'UTR del virus de la diarrea viral -1a y -1b construidos por el método de máxima verosimilitud	55
Figura 11: Dinámica poblacional (<i>Bayesian Skyline</i>) de los conjuntos de secuencias del fragmento 5'UTR del virus de la diarrea viral -1a y -1b.....	57

ABREVIATURAS

°C: grados Celsius	EM: enfermedad de las mucosas
%_{neg}: porcentaje de acuerdo negativo	Es: Especificidad
%_{pos}: porcentaje de acuerdo positivo	FAL-ELISA: ELISA luminométrico asistido por filtración
µl: microlitros	g: fuerza <i>g</i>
µM: micromolar	HPD95%: del inglés <i>highest posterior density</i> 95%
AcN: anticuerpos neutralizantes	hs: horas
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario	IC_{95%}: intervalo de confianza al 95%
ARN: ácido ribonucleico	ICTV: del inglés <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	IF: inmunofluorescencia
AV: aislamiento viral	IHQ: inmunohistoquímica
Cl₂Mg: cloruro de magnesio	Iss: índice de saturación de sustituciones
CO₂: dióxido de carbono	Iss.c: índice crítico de saturación de sustituciones
cp: citopático	INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Cq: valor de ciclo umbral	Kb: kilobases
DICC₅₀/ml: dosis infectivas en cultivo celular 50/ml	log₂: logaritmo base 2
DIVA: del inglés <i>Differentiating Infected from Vaccinated Animals</i>	MCMC: del inglés <i>Markov-Monte Carlo Chains</i>
DMSO: dimetilsulfóxido	MDBK: del inglés <i>Madin-Darby bovine kidney</i>
dNTP: del inglés deoxinucleósido trifosfato	mg: miligramos
DVB: diarrea viral bovina	ml: mililitros
ecp: efecto citopático	min: minutos
EEA: Estación Experimental Agropecuaria	mM: nanomolar
ELISA: del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>	M-MLV: del inglés <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
ELISAag: enzimoimmuno ensayo para la detección de antígeno	nep: no citopático
ELISAab: enzimoimmuno ensayo para la detección de anticuerpos	nd: no determinado

ng: nanogramos

VDVB: virus de la diarrea viral bovina

N-J: Neighbor-Joining

nm: nanometros

OD: del inglés *optical density*

OIE: del inglés *World Organisation for Animal Health*

ORF: del inglés *Open Reading Frame*

PBS: del inglés *Phosphate Buffered Saline*

PCR: del inglés *polymerase chain reaction*

PI: persistentemente infectado

PVDF: polivinilideno fluoruro

qPCR: del inglés *quantitative polymerase chain reaction*

RT: retro-transcripción

RT-nPCR: del inglés *reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction*

RT-PCR: del inglés *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

SDVE: Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado

Se: sensibilidad

seg: segundos

SH-aLRT: del inglés *SH-like approximate likelihood ratio*

SNT: seroneutralización viral

s/s/a: sustituciones/sitio/año

TI: infección transitoria

Tm: temperatura de disociación

tMRCA: del inglés *time to the most recent common ancestor*

UFboot: del inglés *Ultrafast Bootstrap*

UTR: del inglés *untranslated region*

RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* que afecta al ganado bovino en Argentina y en el mundo, ocasionando importantes pérdidas productivas y reproductivas. Uno de los pilares fundamentales en el control de este virus es la identificación y eliminación de los animales persistentemente infectados. Para ello se requieren técnicas diagnósticas de alta sensibilidad/especificidad, rápidas, económicas y adaptadas a la situación epidemiológica local.

En esta tesis se adaptó e implementó un método de reacción en cadena de la polimerasa convencional con transcripción reversa (RT-PCR) para la detección del VDVB en sueros bovinos provenientes de programas de saneamiento del virus y en casos clínicos. Asimismo, se evaluó y comparó el desempeño del aislamiento viral, ELISA para detección de antígeno, RT-PCR convencional y en tiempo real para la detección del VDVB en muestras de sueros y en casos de abortos o mortalidad neonatal. La variabilidad y evolución genética de las cepas obtenidas en este y en otros estudios nacionales se evaluó mediante estudios de filogenia y filodinamia.

La técnica RT-PCR presentó una elevada sensibilidad analítica para su uso en muestras de sueros individuales o en *pools* bajo las condiciones epidemiológicas del país. Mediante la propuesta sanitaria para el control del VDVB se detectó al virus en el 1% de los bovinos y en el 20% de los rodeos. Aunque este trabajo no fue realizado bajo un estricto diseño epidemiológico, los resultados obtenidos aportan datos valiosos a la limitada información de la prevalencia del VDVB en Argentina. Por otra parte, el método RT-PCR mostró un adecuado desempeño para la identificación del virus en muestras de fetos abortados y mortalidad neonatal, que comúnmente presentan alto grado de autólisis y/o contaminación ambiental. Al comparar las técnicas para la detección del VDVB en suero, se demostró que cualquiera de las técnicas evaluadas puede ser empleada para la identificación del virus en muestras individuales de suero. En cuanto a la aplicación de las técnicas diagnósticas para la identificación del VDVB en muestras fetales, se concluye que ambos métodos moleculares fueron más adecuados que el ELISA. Las técnicas moleculares adecuadamente estandarizadas deberían incorporarse de forma rutinaria en los protocolos de diagnóstico de pérdidas reproductivas asociadas al VDVB. El estudio filogenético confirmó la circulación de los subtipos 1a, 1b y 2b del VDVB, con predominio del VDVB-1b. Mediante filodinamia se profundizó la caracterización de los dos subtipos más prevalentes en el país, 1a y 1b. Ambos habrían iniciado su diversificación genética entre las décadas del 50 y 60, en coincidencia con las primeras descripciones clínicas de la enfermedad en el país. El fragmento 5'UTR del VDVB-1a presentó mayor variabilidad genética que el VDVB-

1b, aunque las curvas demográficas mostraron largos períodos de diversidad genética constante en ambos subtipos, confirmando así su naturaleza endémica.

Se concluye que en el país se disponen técnicas de diagnóstico sensibles y específicas para la detección del VDVB; dependiendo su elección de diversos factores como el tipo de muestra, cantidad de individuos a evaluar, presentación clínica, infraestructura del laboratorio, costos, entre otros. La información obtenida a partir de los estudios genéticos contribuye al conocimiento de la historia evolutiva del VDVB en Argentina, siendo estos datos útiles para el diseño y evaluación de estudios epidemiológicos, herramientas diagnósticas y programas de control de la enfermedad.

SUMMARY

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) belongs to the genus *Pestivirus* in the *Flaviviridae* family that affects cattle in Argentina and worldwide, causing significant productive and reproductive losses. One of the main aspects in the control of this virus is the identification and removal of persistently infected animals. For this purpose, diagnostic techniques with high sensitivity/specificity, fast, low-cost, and locally adapted to the epidemiological situation are necessary.

A conventional reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was adapted and implemented for BVDV detection in bovine sera from herds enrolled in BVDV control programs, and from herds with clinical cases. Additionally, the performance of virus isolation, antigen-capture ELISA, conventional and real-time RT-PCR was evaluated and compared for BVDV detection in serum samples and in cases of abortion or neonatal mortality. The diversity and genetic evolution of the BVDV strains obtained in this, and in other national studies, were evaluated through phylogeny and phylodynamic studies.

The RT-PCR method presented a high analytical sensitivity for BVDV detection in individual serum samples or in pools under the epidemiological conditions of the country. BVDV was detected in 1% of the cattle and in 20% of the herds. Although the current research was not conceived as an epidemiological study, the obtained results are a relevant contribution to the limited knowledge of BVDV prevalence in Argentina. On the other hand, the RT-PCR method showed a good performance for BVDV identification in aborted fetuses and neonatal mortality samples, which usually present high autolysis degree and/or environmental contamination. Comparisons among diagnostic techniques showed that any of the evaluated methods can be selected for BVDV detection in individual serum samples. Regarding the application of diagnostic techniques for BVDV detection in fetal samples, it is concluded that both molecular methods were more suitable than the antigen-capture ELISA. Molecular techniques should be routinely incorporated for diagnostic protocols for BVDV-related reproductive losses. The phylogenetic study confirmed the circulation of BVDV-1a, -1b and -2b, being BVDV-1b the most frequent subtype. The most prevalent subtypes in the country, BVDV-1a and -1b, were further characterized through phylodynamic analysis. Both subtypes would have begun their genetic diversification between the 1950s and 1960s, consistent with the first clinical descriptions of the disease in the country. Although BVDV-1a presented a greater 5'UTR genetic diversity than BVDV-1b, the demographic curves showed long periods of constant genetic diversity in both subtypes, confirming its endemic nature.

In conclusion, reliable diagnostic techniques for BVDV detection are available in the country. Therefore, the choice of diagnostic techniques will depend on various factors such as sample type, number of samples, clinical presentation, laboratory infrastructure, and

costs. The results obtained from the genetic studies contribute to the knowledge of the evolutionary history of BVDV in Argentina. Moreover, these data could be useful for the design and evaluation of epidemiological studies, diagnostic tools, and disease control programs.

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales del virus de la diarrea viral bovina

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* del reino *Riboviria* (ICTV, 2019) relacionado con los virus de la peste porcina clásica y de la enfermedad ovina de la frontera. Puede infectar a bovinos y otras especies del género artiodáctilo como cabras, ovejas, cerdos, jirafas y otros rumiantes silvestres (Donis, 1995; Simmonds y col., 2017). Si bien su denominación implica enfermedad intestinal, el VDVB afecta a diferentes aparatos y sistemas del organismo como el respiratorio, reproductor e inmunológico. Este virus utiliza múltiples estrategias para asegurar su supervivencia y propagación como la supresión inmunológica del huésped, transmisiones directas e indirectas y la más importante desde el punto de vista epidemiológico, la generación de animales persistentemente infectados (PI) que eliminan y transmiten el virus durante toda su vida.

El VDVB tiene distribución mundial afectando a bovinos de todas las razas y edades (OIE, 2018) con gran impacto económico para la industria ganadera en forma directa, debido a menor producción por enfermedad, mortandad y pérdidas reproductivas, e indirectas por los costos incurridos en su control y, eventualmente, en su erradicación (Gunn y col., 2004; Pinior y col., 2017; Ritcher y col., 2017). El control exitoso del VDVB requiere de un enfoque multidisciplinario que incluye la identificación y eliminación de los animales PI, vacunación y la aplicación de medidas de bioseguridad para evitar el ingreso o reingreso del virus.

Descripción del virus de la diarrea viral bovina

El VDVB es un virus ARN envuelto de cadena simple y sentido positivo de aproximadamente 12,3 kb de longitud. Posee un marco de lectura abierto (ORF) flanqueado por dos regiones no codificantes (5' y 3' UTR) (Simmonds y col., 2017). El ORF codifica una única poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos que luego de su traducción es escindida por proteasas celulares y virales para la producción de 11-12 proteínas virales: N^{pro}, C, E0/E^{ns}, E1, E2, p7, NS2/3 (NS2-NS3), NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Neill, 2013; Tautz y col., 2015).

En base a características genéticas (Ridpath y col., 1994) y antigénicas (Ridpath y col., 2000), el VDVB puede dividirse en dos especies o tipos: VDVB-1 y VDVB-2, también denominados como *Pestivirus A* y *B*, respectivamente, según la nueva clasificación del ICTV (2019). Recientemente se ha propuesto una tercera especie del VDVB denominada HoBi-like o VDVB-3 (Liu y col., 2009; Bauermann y col., 2013) o *Pestivirus H* (ICTV, 2019). Debido a que el VDVB es un virus ARN, las mutaciones durante su replicación ocurren fácilmente, generando considerables variaciones genéticas, antigénicas y patogénicas (Duffy y col.,

2008). El análisis filogenético de diferentes regiones del genoma (5'UTR, E2, N^{pro}, NS2/3, NS5B) permite clasificar al VDVB-1 en al menos 21 subtipos (1a-1u), al VDVB-2 en 4 subtipos (2a-2d) y al VDVB-3 en 4 subtipos (3a-3d) (Giangaspero y col., 2008; Jenckel y col., 2014; Giammarioli y col., 2015; Yesilbag y col., 2017).

Independientemente del tipo y subtipo, el VDVB puede existir como biotipo citopático (cp) y no citopático (ncp) basado en su comportamiento en cultivos celulares *in vitro* (Brownlie, 1990). El biotipo cp es generado por cambios en la secuencia codificante del fragmento NS2/3 que resulta en la escisión de la proteína en grandes cantidades de NS2 y NS3. Estos cambios genómicos pueden ser producto de duplicaciones genómicas (Qi y col., 1992; Nettleton y Entrican, 1995), inserciones de ARNm celulares (Qi y col., 1992; Vilcek y col., 2000) y mutaciones puntuales (Kummerer y col., 2000). Por su parte, el biotipo ncp produce pequeñas cantidades de proteínas NS2 y NS3 necesarias para su replicación sin dañar las células en cultivos *in vitro* (Lackner y col., 2004). Esta característica le permite al biotipo ncp establecer infecciones persistentes cuando la hembra gestante es infectada durante el primer trimestre de gestación (Grooms, 2004). El biotipo ncp es el más abundante en la naturaleza y está asociado con la mayoría de las presentaciones clínicas de la enfermedad (Ridpath, 2010; Neill, 2013).

Transmisión y epidemiología

El VDVB puede ser transmitido de forma directa, principalmente por ingestión o inhalación a través del contacto con saliva, descargas óculo-nasales, secreciones uterinas, placenta, semen, orina y heces de animales PI o de animales con infección transitoria (TI) (Meyling y col., 1990; Nettleton y Entrican, 1995). Además, el virus es capaz de cruzar la barrera placentaria generando diferentes cuadros en el feto según el momento de la gestación en la que ocurre la infección (Grooms, 2004). También se ha descrito la vía de transmisión indirecta por vectores como insectos hematófagos (Chamorro y col., 2011), la iatrogénica por agujas o instrumental quirúrgico (Niskanen y Lindberg, 2003) y la transmisión por fómites (Stevens y col., 2011).

Estudios serológicos a nivel mundial han mostrado variaciones considerables en el número de animales seropositivos al VDVB con prevalencias inferiores al 1% o mayores al 90%, siendo seropositivos entre el 46 y 93% de los rodeos (Ritcher y col., 2019). Diferentes trabajos realizados en el país mostraron alta seroprevalencia del VDVB en diversas regiones (Rweyemamu y col., 1990; Odeón y col., 2001; Pacheco y Lager, 2003).

Como fue citado previamente, una situación clave en la epidemiología del VDVB es el desarrollo de infecciones persistentes. Los terneros PI desarrollan viremia continua y eliminan virus en sus secreciones durante toda su vida (Ridpath, 2010). Por esta razón, son el principal reservorio para la transmisión y mantenimiento del VDVB en la población bovina,

ya sea dentro o entre establecimientos ganaderos (Grooms, 2004; Brodersen, 2014). Asimismo, las hembras PI pueden abortar o transmitir el virus al feto y generar una progenie de animales PI. La prevalencia de animales con infección persistente en poblaciones con circulación viral varía entre el 0,2 y 4% (Scharnböck y col., 2018; Ritcher y col., 2019), con casos extremos de hasta el 12% en condiciones particulares de manejo (González Altamiranda y col., 2012) o del 30% en categorías jóvenes (Kane y col., 2015).

El VDVB es un agente etiológico importante con efecto negativo en todas las etapas reproductivas del ganado bovino. Ha sido asociado a menores tasas de concepción, muerte embrionaria y abortos, entre otros (Grooms, 2004). La bibliografía internacional muestra entre 1,5 y 27,2% de aislamiento del VDVB en fetos bovinos abortados (Murray, 1991; Kirkbride y col., 1992; Cabel, 2007; Clothier y Anderson, 2016). A nivel nacional, las tasas de detección del VDVB oscilan entre el 1,3 y 10,3% (Campero y col., 2003; Morrel y col., 2019). En un análisis retrospectivo de 117 casos de abortos, Fernández y col. (2007) no hallaron fetos con aislamiento del VDVB, adjudicándose este resultado a la baja calidad de las muestras remitidas por el avanzado grado autolisis que presentaban. Por el contrario, Muñoz y col. (1996) obtuvieron 21% de aislamiento del VDVB en fetos bovinos aparentemente sanos obtenidos de mataderos comerciales, hallazgo que confirmaría que la autolisis y contaminación de los tejidos disminuye la sensibilidad de pruebas diagnósticas utilizadas habitualmente como el aislamiento viral (AV).

La presencia de títulos de anticuerpos contra el VDVB en fluidos fetales indica infección viral ya que la placenta del bovino no permite la difusión de anticuerpos maternos al feto (Kirkbride y Johnson, 1989). Diferentes estudios en Argentina han documentado frecuencias en la detección de anticuerpos del 2% en fetos de frigoríficos (Pinto y col., 1993; Muñoz y col., 1996) y entre 4 y 45% en fetos abortados (Moore y col., 2003; Fernández y col., 2007; Späth y Becker, 2012).

Presentación clínica

La infección con el VDVB puede generar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde infecciones subclínicas imperceptibles hasta cuadros severos que causan la muerte del animal (Baker, 1995). La presentación clínica varía dependiendo de factores del huésped (estado inmunitario, momento de la gestación), factores ambientales (infecciones simultáneas) y de la cepa viral (biotipo, variaciones genéticas y antigénicas) (Walz y col., 2010; Evans y col., 2019).

Una proporción significativa, del 70 al 90%, de las infecciones por el VDVB resulta en presentaciones subclínicas (Baker, 1995). En ocasiones los animales que cursan una infección subclínica pueden desarrollar leve hipertermia, leucopenia temporal y mermas en la producción.

Las infecciones agudas en animales no gestantes y sin previa inmunidad generan una viremia transitoria que abarca desde los tres días posinfección hasta la generación de la respuesta inmunitaria, aproximadamente a las dos semanas posteriores (Pedrera y col., 2011). Los signos clínicos en una infección aguda incluyen hipertermia, anorexia, letargia, descargas óculo-nasales, diarrea y presencia de erosiones o úlceras en mucosas (Lanyon y col., 2014). Dado que el VDVB es linfotrópico, genera leucopenia que puede resultar en una inmunosupresión transitoria, disminuyendo la resistencia del animal a otros patógenos (Chase y col., 2004) o agravando los signos clínicos luego de una infección bacteriana secundaria (Ridpath, 2010).

Presentaciones severas de curso agudo o subagudo, con alta morbilidad y mortalidad han sido descritas (Odeón y col., 2003; Lunardi y col., 2008; Hessman y col., 2012). En este tipo de cuadros se ha observado depleción linfoidea severa en timo, nódulos mesentéricos y placas de Peyer, así como erosiones, úlceras y hemorragia en tracto gastrointestinal. La signología clínica, con variaciones en la severidad, puede consistir en inapetencia, letargia, diarrea y mermas en la producción.

Las infecciones con el VDVB antes de la concepción o en estadios tempranos de la gestación (hasta aproximadamente los 45 días) pueden generar infertilidad o muerte embrionaria con repetición de celo (McGowan y col., 1993). La infección de la hembra gestante con el VDVB puede resultar en transmisión transplacentaria e infección del feto con diferentes consecuencias según el estado inmunitario de la hembra, la cepa viral involucrada y el momento de la gestación (Grooms, 2004). La infección fetal con el biotipo ncp entre el día 42 y 125 de gestación, momento en que el sistema inmunitario fetal aún no está completamente desarrollado, resulta en la generación de animales PI (Grooms, 2004) que desarrollan tolerancia inmunitaria a la cepa viral infectante (Peterhans y col., 2010). Si estos animales son infectados con una cepa cp homóloga desarrollan un cuadro clínico diarreico, severo y fatal denominado enfermedad de las mucosas (Bolin, 1990).

Además de la infección persistente, otras presentaciones en la afección del tracto reproductivo incluyen aborto, momificación o malformaciones congénitas y nacimiento de terneros débiles (Grooms, 2004). El aborto por el VDVB ocurre frecuentemente antes de los 125 días de gestación, aunque abortos en periodos de gestación más avanzada, partos prematuros o nacimiento de terneros débiles también se han descrito (Grooms, 2004; Brock y col., 2005).

Métodos de diagnóstico del virus de la diarrea viral bovina

Actualmente existen diversas pruebas disponibles para la detección del virus, o sus componentes estructurales (antígeno) o ácido nucleico, y de anticuerpos específicos dirigidos al virus (Dubovi, 2013; Lanyon y col., 2014). Estas técnicas incluyen, entre otras, el

AV, inmunohistoquímica (IHQ) o inmunofluorescencia (IF), enzimoimmuno ensayo para la detección de antígeno (ELISAag) y pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR). Las técnicas serológicas comúnmente utilizadas son la seroneutralización viral (SNT) y ELISA (Saliki y Duvobi, 2004). La elección en la implementación de alguna de estas técnicas dependerá del cuadro clínico, tamaño del rodeo, edad de los animales, disponibilidad local de las pruebas diagnósticas, de aspectos económicos (Walz y col., 2010) y del objetivo de diagnóstico (Tabla 1).

Tabla 1: Métodos disponibles para el diagnóstico del virus de la diarrea viral bovina según el objetivo establecido (adaptada de OIE, 2018)

Método	Objetivo					
	Población libre de infección	Individuo libre de infección	Programas saneamiento	Confirmación casos clínicos	Estudios prevalencia	Evaluación inmunitaria
Identificación del virus						
AV	+	+++	++	+++	-	-
IHQ	-	-	-	++	-	-
ELISAag	++	+++	+++	+++	+++	-
RT-PCR	+++	+++	+++	+++	+++	-
Detección de anticuerpos						
SNT	+	+++	++	-	+	+++
ELISAab	+++	++	+++	-	+++	+++

AV: aislamiento viral; IHQ: inmunohistoquímica; ELISAag: ELISA para detección de antígeno; RT-PCR: transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa; SNT: seroneutralización; ELISAab: ELISA para detección de anticuerpos

+++ : recomendado; ++ : adecuado; + : puede ser utilizado en algunas situaciones; - : no adecuado

Detección del virus

Sea el objetivo detectar el VDVB en sí mismo o detectar algunos de sus componentes, para fines diagnósticos es importante distinguir entre partículas virales infecciosas y no infecciosas (virus inactivado o neutralizado) (Sandvik, 2005). La forma infecciosa generalmente está en bajas concentraciones en materiales de uso biológico en laboratorios como el suero fetal (Bolin y Ridpath, 1998), en semen de toros con infección aguda (Givens y col., 2003) y en vacunas vivas modificadas (Ridpath, 2010). El método adecuado a utilizar en cada situación particular dependerá de la edad del animal, si está vivo o muerto y si el interés está enfocado en la detección sólo de animales PI o también de animales TI (Larson, 2005). Todos los métodos deben ser validados en poblaciones con y sin infección por el

VDVB y deben tener la capacidad de detectar todo el rango de variantes génicas y antigénicas de las cepas circulantes en la región (OIE, 2018).

Aislamiento viral

El AV en cultivos celulares es la prueba de referencia o estándar de oro para detectar el VDVB (Saliki y Dubovi, 2004; Edmonson y col., 2007). Se han desarrollado diversos protocolos que difieren en la línea celular utilizada, periodos de incubación y frecuencia de pasajes del inóculo. Todos los componentes biológicos utilizados deben monitorearse regularmente para descartar la presencia del VDVB contaminante o de anticuerpos neutralizantes anti-VDVB. Dado que la mayoría (70-90%) de los aislamientos del VDVB son del biotipo ncp (Brock, 1995; Saliki y Dubovi, 2004), las células inoculadas con la muestra problema deben ser examinadas por inmunomarcaje (fluorescencia o enzimático) para detectar la presencia de proteínas virales (OIE, 2018).

Además del protocolo empleado para AV, otros factores que pueden influir sobre el desempeño del método son el tipo muestra que se recolecta según el cuadro clínico y el transporte/procesamiento de esta (Dubovi, 2013). En un animal vivo, la mejor muestra para la aplicación del AV es sangre entera para extracción de leucocitos. En el caso de una necropsia, se considera como muestra ideal a los órganos linfoides como el bazo, placas de Peyer del intestino delgado, linfonódulos mesentéricos y timo. Otros especímenes frecuentemente utilizados (suero, hisopado nasal, semen, entre otros) pueden no ser de elección debido a la interferencia de anticuerpos neutralizantes. En animales PI, cualquier muestra sería adecuada para la detección del VDVB por AV debido a la elevada concentración de partículas virales en secreciones, excreciones y tejidos (Saliki y Dubovi, 2004).

El AV tiene una especificidad diagnóstica del 100% (Ellis y col., 1995; Ridpath y col., 2009), pero su sensibilidad es considerada media o baja. Es una técnica laboriosa que requiere infraestructura compleja y personal altamente entrenado, pudiendo interferir en los resultados la presencia de anticuerpos y/o la calidad y oportunidad en la obtención de muestra clínica (Zimmer y col., 2004; Dubovi, 2013). Estos factores hacen del AV una técnica poco apropiada para el diagnóstico del VDVB a gran escala, como lo son los programas de saneamiento.

Inmunohistoquímica - inmunofluorescencia

La detección de antígenos del VDVB por IF ha sido utilizada habitualmente como método de *screening* (Saliki y Dubovi, 2004; Dubovi, 2013). Si bien es una técnica rápida, son necesarios técnicos entrenados para interpretarla y no posee una sensibilidad elevada

(Saliki y Dubovi, 2004). Esta técnica ha sido reemplazada por la detección de antígenos en tejidos fijados en formol mediante el uso de IHQ. Su implementación en muestras de tejido auricular es utilizada rutinariamente para detección de animales PI dado que es fácil de obtener y no existe interferencia de anticuerpos colostrales (Cornish y col., 2005; Driskell y Ridpath, 2006; Zimmer y col., 2004). Si bien la velocidad de su implementación hace de la IHQ una técnica apropiada para un gran número de muestras, presenta desventajas tales como su restricción al tipo de tejido a muestrear, requiere de labor intensiva, personal entrenado y no es recomendado su uso en muestras conservadas en formalina por más de 15 días (Cornish y col., 2005; Driskell y Ridpath, 2006). La OIE (2018) recomienda la utilización de IHQ solo para fines de investigación o para la confirmación de casos clínicos.

ELISA para detección de antígeno

El método ELISAag se utiliza para detectar la presencia de antígeno viral en diferentes tipos de muestras como sangre, suero, biopsias de piel y leche (Sandvik, 2005; Lanyon y col., 2014). Dado que el ELISAag no es un método de amplificación como el AV o la detección de ácido nucleico, las muestras deben contener suficiente cantidad de la proteína viral a detectar, lo que minimiza el riesgo de contaminación cruzada y favorece la detección de animales PI por sobre animales TI (Sandvik, 2005). Existe una amplia variedad de ELISAag comerciales, basados en anticuerpos monoclonales y policlonales, principalmente dirigidos a antígenos altamente conservados del virus como NS2/3 y E^{ms}. La concentración de NS2/3 puede ser baja fuera de la célula, por lo que los métodos ELISA basados en este antígeno han sido desarrollados con *buffers* para lisar las células y liberar de su interior la proteína viral. Por otro lado, los ELISA basados en E^{ms} tienen la ventaja de requerir un procesamiento mínimo o nulo de la muestra ya que las células infectadas por el VDVB liberan altas concentraciones de esta proteína (Dubovi, 2013). Diversos estudios han demostrado que la sensibilidad y especificidad del ELISAag es cercana al 95-100% (Sandvik, 2005; Lanyon y col., 2014).

Esta metodología requiere un mínimo procesamiento del espécimen a analizar, posee buena sensibilidad, especificidad y repetibilidad (Dubovi, 2013). Estas características hacen del ELISAag una prueba de diagnóstico de fácil transferencia y aplicación en la detección de animales PI a gran escala. Sin embargo, no se han obtenido buenos resultados a partir de su uso en *pools* de muestras (Cleveland y col., 2006; Hanon y col., 2014; Lanyon y col., 2014). La presencia de anticuerpos puede afectar negativamente la sensibilidad de este tipo de método diagnóstico, situación que ocurre frecuentemente en terneros jóvenes por la presencia de anticuerpos colostrales o en aquellos individuos que se han vacunado en varias ocasiones, especialmente con vacunas a virus vivo (Fux y Wolf, 2012).

RT-PCR

La detección del ácido nucleico viral mediante el método de RT-PCR puede realizarse prácticamente a partir de cualquier tipo de muestra (Saliki y Duvobi, 2004; Dubovi, 2013). Se han descrito diversos formatos de esta técnica, divididos principalmente en dos grupos: PCR convencional o de punto final y PCR en tiempo real o cuantitativa. Ambos tipos de PCR han mostrado niveles de sensibilidad y especificidad similares para la detección del VDVB, con alta repetitividad y concordancia cercana al 100% (Letellier y Kerkhofs, 2003; Zhang y col., 2014; Mari y col., 2016). Asimismo, la PCR en tiempo real ofrece la ventaja de ser más rápida, es menos propensa a contaminaciones por la mínima manipulación del usuario y permite la cuantificación de copias virales en la muestra (Espy y col., 2006; Zhag y col., 2014).

La alta sensibilidad analítica, o límite de detección, del método RT-PCR permite su utilización en *pools* de muestras disminuyendo los costos en programas de saneamiento (Weinstock y col., 2001; Kennedy y col., 2006; Walz y col., 2010). La presencia de anticuerpos (Weinstock y col., 2001; Zimmer y col., 2004; Larson, 2005), la incorrecta conservación o transporte de la muestra, o la viabilidad del virus generalmente tienen poco efecto sobre la sensibilidad analítica de la RT-PCR (Saliki y Duvobi, 2004). No obstante, debe considerarse que es posible obtener resultados positivos a esta técnica diagnóstica a partir de muestras con virus inactivado o no viable, por lo que la detección del ARN viral no implica en sí mismo la presencia de virus infectivo (Dubovi, 2013; OIE, 2018).

Un factor limitante para considerar en la implementación de las técnicas moleculares es la calidad de extracción del ARN viral de los especímenes a evaluar (Hamel y col., 1995; Sandvik, 2005). Es importante que el método de extracción remueva ARNasas, proteínas y factores inhibidores que podrían interferir con la amplificación del ADN complementario previo a la reacción de PCR (Hyndman y col., 1998) y que permita el procesamiento de gran cantidad de muestras de forma sencilla, rápida y económica. Además de la calidad del ARN, la sensibilidad y especificidad del método de PCR pueden ser afectadas por el diseño de los oligonucleótidos. Por lo tanto, el diseño de estos debe basarse en regiones altamente conservadas del genoma viral, como lo son 5'UTR, NS5B o N^{pro} (Schweizer y Peterhans, 2014).

Detección de anticuerpos

La detección de anticuerpos específicos mediante pruebas serológicas constituye una herramienta indirecta en el diagnóstico del VDVB. Una de las dificultades que puede presentarse es la diferenciación entre la respuesta humoral a una infección natural, a la vacunación o a la presencia de anticuerpos colostrales (Walz y col., 2010). Los individuos negativos a anticuerpos anti-VDVB usualmente son considerados *naïve* o susceptibles al

virus. Del mismo modo, los animales PI son generalmente negativos a la presencia de anticuerpos específicos, mientras que aquellos positivos pueden considerarse como individuos que no son PI. No obstante, es posible detectar anticuerpos calostrales en animales PI jóvenes o en animales PI que han sido expuestos a una cepa parcialmente homóloga o heteróloga a la que causó la infección persistente (Fulton y col., 2003b). Dado estos inconvenientes, los métodos serológicos deben ser utilizados junto a métodos de detección del virus para una correcta interpretación (Evans y col., 2019).

El diagnóstico serológico puede ser utilizado para evaluar la efectividad de una vacuna o protocolo de vacunación, evaluar la circulación viral en un rodeo o determinar si un ternero ha sido infectado *in utero* (Dubovi, 2013). Si bien existen diferentes métodos para la detección de anticuerpos anti-VDVB, los más utilizados son la prueba de seroneutralización viral (SNT) y el método de ELISA para anticuerpos (ELISAab) (Sandvik, 2001; Houe y col., 2006).

Seroneutralización viral

La SNT consiste en un sistema biológico *in vitro* que cuantifica el efecto inhibitorio de anticuerpos específicos sobre la replicación viral en cultivos celulares (Sandvik, 2001). Esta técnica es considerada la prueba de referencia para la detección de anticuerpos anti-VDVB (Dubovi, 2013). En general, su empleo está limitado a laboratorios especializados con equipamiento adecuado y personal entrenado para el manejo de cultivos celulares, requiriendo de mano de obra intensiva con 4 a 6 días de trabajo, por lo que se la considera una técnica costosa y laboriosa (Sandvik, 2005; Houe y col., 2006).

La SNT es el único método que cuantifica el título de anticuerpos considerando las diferencias antigénicas existentes entre los tipos y subtipos del VDVB (Dubovi, 2013). Por lo tanto, mediante el empleo de diferentes cepas virales, es posible evaluar la sero-reactividad cruzada o SNT cruzada en una muestra frente a las variantes génicas y antigénicas del virus. Al respecto, se han encontrado diferentes niveles de anticuerpos neutralizantes según el subtipo del VDVB utilizado (Pizarro-Lucero y col., 2006; Ridpath y col., 2010; Bauermann y col., 2012; Pecora y col., 2014). Esta variabilidad puede tener implicancias negativas en las estrategias de diagnóstico e inmunización (Pizarro-Lucero y col., 2006; Ridpath, 2010).

La sensibilidad y especificidad de la SNT dependerá del tipo celular y de las cepas virales de referencia empleadas (Dubovi, 2013; Lanyon y col., 2014). Por ejemplo, si un animal se infectó con el VDVB-2, se obtendrá una mayor sensibilidad utilizando al tipo 2 como virus de desafío en la SNT en comparación a utilizar una cepa del VDVB-1, ya que ambos tipos son antigénicamente distintos (Ridpath, 2010). En la práctica deberían seleccionarse cepas del VDVB que detecten la mayor proporción de reacciones serológicas de la población en una región o país para aumentar la sensibilidad de la técnica (Saliki y

Dubovi, 2004; Bauermann y col., 2012; OIE, 2018), aunque es probable que no existan una o más cepas ideales para todas las circunstancias.

ELISA para detección de anticuerpos

El método de ELISAab implica menores costos y tiempo en comparación a la SNT, no requiere del uso de cultivos celulares y virus, arrojando resultados en solo unas horas. La disponibilidad de ELISAab comerciales reduce la variabilidad de resultados entre laboratorios y facilita su automatización. Por lo tanto, esta técnica permite el análisis de grandes cantidades de muestras individuales o en *pools* (Sandvik, 2005).

A diferencia de la SNT, el ELISAab determina ausencia o presencia de anticuerpos (Dubovi, 2013) pero es posible obtener resultados semi-cuantitativos en términos de densidad óptica (Graham y col., 1997; Lanyon y col., 2014). Con esta técnica no es posible diferenciar el tipo o subtipo del VDVB al cual el animal ha sido expuesto. A pesar de estas diferencias, diversos estudios han demostrado una concordancia excelente, junto con elevada sensibilidad y especificidad, en la detección de anticuerpos anti-VDVB por ambos métodos (Beaudeau y col., 2001; Graham y col., 2003; Lanyon y col., 2013).

La técnica de ELISAab es la más usada para evaluar seroprevalencia del VDVB utilizando muestras de suero o leche (Houe y col., 2006). La inducción de anticuerpos vacunales puede interferir en la interpretación de los resultados y a la fecha no hay disponibles vacunas comerciales marcadoras o DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) para el VDVB. Sin embargo, se ha reportado que no todas las vacunas inactivadas inducen anticuerpos contra la proteína NS2/3 del VDVB. Este anticuerpo es detectado posinfección viral ya que la proteína NS2/3 es sintetizada durante la replicación (Graham y col., 2003; Álvarez y col., 2012; González y col., 2014). Esta observación es la base para diferenciar animales vacunados e infectados, indicando que las técnicas de ELISAab comerciales basadas en la detección de anticuerpos anti-NS3/2 podrían ser una herramienta útil para evaluar la exposición viral (Makoschey y col., 2007). Debe considerarse que repetidas vacunaciones a lo largo de la vida de un animal puede inducir títulos detectables de anticuerpos anti-NS2/3 en suero (Graham y col., 2003; Álvarez y col., 2012; González y col., 2014), siendo más factible de aplicar este método en leche de tanque (Kuijk y col., 2008; Álvarez y col., 2012; Sayers y col., 2015).

Métodos de diagnóstico en programas de control del virus de la diarrea viral bovina

Debido a su distribución mundial y consecuencias económicas, desde 2007 la diarrea viral bovina (DVB) es considerada una enfermedad notificable por la OIE. Para el control del

VDVB deben considerarse tres aspectos importantes: 1) identificación y eliminación de animales PI; 2) inmunización a través de la vacunación e 3) implementación de medidas de bioseguridad para prevenir el reingreso del virus a los rodeos (Walz y col., 2010). Estos principios han sido, o están siendo aplicados con éxito en el control y erradicación de la DVB en diversos países (Evans y col., 2019). El nivel en que la presencia del virus es reducida difiere si se busca el control o la erradicación de la enfermedad (Houe y col., 2006). Los programas de control tienen como objetivo reducir la prevalencia de la enfermedad, en tanto que los programas de erradicación están diseñados para eliminar y mantener ausente la presencia del virus en una población dada (Houe y col., 2006). Ambos objetivos pueden ser alcanzados y llevados adelante a nivel nacional, regional o predial. Los países en los que se implementan programas de control/erradicación tienen, en promedio, una prevalencia a nivel animal y de rodeo 1,5 veces menor que aquellos países sin medidas de control del VDVB (Scharnböck y col., 2018).

Como se mencionó anteriormente, una de las premisas necesarias para el control del VDVB, es la identificación y eliminación de los animales PI (Laureyns y col., 2010; Walz y col., 2010). Para lograr este objetivo es necesario muestrear toda la población bovina del establecimiento ganadero en saneamiento. Debido a la logística necesaria para ello y al factor económico que representa el diagnóstico, es imprescindible disponer de técnicas diagnósticas rápidas y económicas con alta sensibilidad y especificidad. Dado los inconvenientes que presenta el AV, su uso en programas de control o erradicación para identificación de animales PI ha sido reemplazado por el método ELISAag y RT-PCR (Dubovi, 2013; Evans y col., 2019). Actualmente, se emplean tres formatos para detección de animales PI: 1) IHQ en muestras individuales de tejido auricular; 2) ELISAag en muestras individuales de suero, tejido auricular o leche y 3) RT-PCR en *pools* de suero, sangre, leche o tejido auricular (Dubovi, 2013). En la Tabla 2 se detallan algunas características de los métodos de detección del VDVB en programas de control/erradicación.

Tabla 2: Métodos de diagnóstico para la detección del virus de la diarrea viral bovina en programas de saneamiento
(adaptada de Larson y col., 2005a y Dubovi, 2013)

Método de diagnóstico	Tiempo	Costo	Ventajas	Desventajas	Muestras utilizadas frecuentemente
AV	1-3 semanas	Moderado/alto	<ul style="list-style-type: none"> • Es la prueba de referencia • Alta especificidad • El virus queda disponible para estudios posteriores 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempos prolongados para obtener un resultado • Trabajo de laboratorio intensivo • Potenciales falsos negativos por interferencia con anticuerpos 	<ul style="list-style-type: none"> • Sangre entera • Suero
IHQ	2-5 días	Bajo	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad • Usualmente identifica animales PI 	<ul style="list-style-type: none"> • Trabajo de laboratorio intensivo • Uso de formalina • Usualmente no identifica animales TI 	<ul style="list-style-type: none"> • Tejido auricular
ELISAag	1-5 días	Bajo/moderado	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad • Usualmente identifica animales PI 	<ul style="list-style-type: none"> • Potenciales falsos negativos por interferencia con anticuerpos 	<ul style="list-style-type: none"> • Suero • Tejido auricular
RT-PCR	1-3 días	Moderado/alto	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad • La implementación de <i>pools</i> reduce costo y tiempo 	<ul style="list-style-type: none"> • Potenciales falsos positivos por contaminaciones intralaboratorio 	<ul style="list-style-type: none"> • Sangre entera • Suero

AV: aislamiento viral; IHQ: inmunohistoquímica; ELISAag: ELISA para detección de antígeno; RT-PCR: transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa; PI: persistentemente infectado; TI: transitoriamente infectado

Las técnicas serológicas también son empleadas en los programas de control/erradicación. En regiones donde no se vacuna, la serología puede brindar evidencia de circulación del VDVB, mientras que en aquellos lugares en los que se vacuna, el uso de animales sin vacunar o centinelas pueden ser utilizados para determinar la exposición viral del rodeo o de una determinada categoría (Walz y col., 2010; Dubovi, 2013). Una alta seroprevalencia en ausencia de vacunación es indicativa de infección viral, posiblemente con presencia de animales PI, en tanto que bajos niveles de seroprevalencia pueden asociarse a la ausencia de infecciones persistentes (Houe y col., 2006).

La inmunización a través de la vacunación es un componente importante en los programas de control, siendo asociada la efectividad de esta a la disminución de la transmisión del virus. A través de la vacunación se buscan dos objetivos: disminuir la signología y consecuencias negativas asociadas a la enfermedad clínica y prevenir la infección fetal que puede causar pérdidas de la gestación y generación de animales PI (Ridpath, 2010; Newcomer y col., 2017). Existe una gran variedad de vacunas disponibles para el VDVB en el mercado, generalmente en combinación con otros agentes virales y bacterianos, que además pueden ser inactivadas o vivas modificadas (Newcomer y col., 2017). En Argentina está permitido el uso de vacunas inactivadas, las cuales están formuladas a partir de cepas de referencia del VDVB-1a y ocasionalmente con el tipo 2 (Jones y col., 2001; Fernández y col., 2009; Pecora y col., 2014). Los métodos de diagnóstico sirven de apoyo a los planes de vacunación ya que la serología puede utilizarse para verificar la correcta inmunización; mientras que la detección del virus junto con la serología fetal es útil para corroborar si la vacunación está previniendo la infección transplacentaria (Dubovi, 2013). Aunque la protección conferida por la vacunación no es del 100%, cuando se emplean planes apropiados, la frecuencia de detección de animales PI se reduce (Walz y col., 2010). A pesar de los efectos beneficiosos de la vacunación, por sí sola no es una herramienta válida para la eliminación del VDVB de una población.

La implementación de medidas de bioseguridad está orientada a impedir el ingreso o reingreso del VDVB. Antes de incorporar animales a un rodeo, todos deberían ser analizados para corroborar la ausencia del virus (Walz y col., 2010). En este sentido, las vacas gestantes cumplen un rol importante ya que a la fecha no se dispone de métodos de diagnóstico factibles para determinar si un feto gestante está infectado con el VDVB (Evans y col., 2019). Por otra parte, el semen (González Altamiranda y col., 2012), embriones (Bielanski y col., 2009; Da Silva Cardoso Pinto y col., 2017) o instrumental veterinario (Niskanen y Lindberg, 2003) también representan vías de transmisión del virus y deberían ser consideradas. La vigilancia mediante el empleo de métodos de diagnóstico es una herramienta esencial como medida de bioseguridad dado el riesgo continuo de exposición a bovinos u otros animales capaces de transmitir el virus.

Métodos de diagnóstico de abortos por el virus de la diarrea viral bovina

Los procedimientos de diagnóstico de aborto o muerte neonatal por el VDVB varían entre laboratorios, siendo comúnmente utilizados el AV, IHQ, RT-PCR y SNT. El diagnóstico de aborto bovino a nivel nacional e internacional es generalmente bajo (Campero y col., 2003; Cabell, 2007; Clothier y Anderson, 2016; Morrel y col., 2019). Este bajo porcentaje de detección está asociado a que el feto ocasionalmente es retenido en útero semanas antes de su expulsión sufriendo rápida autólisis (Duffel y col., 1984; Murray, 1991) y una vez expulsado, el feto es expuesto a las condiciones ambientales y a la presencia de animales carroñeros (Cabel, 2007; Holler, 2012). Estas situaciones disminuyen la sensibilidad de los métodos diagnósticos (Cabell, 2007; Ridpath y col., 2014), especialmente de la técnica de AV, donde el tejido puede resultar tóxico para los cultivos celulares, o bien puede inactivar al virus presente (Ellis y col., 1995; Hyndmann y col., 1998; Tramuta y col., 2011). Dadas estas circunstancias, la sensibilidad de detección del VDVB por AV generalmente es menor a lo esperado (Kirkbride y col., 1992; Campero y col., 2003; Clothier y Anderson, 2016; Morrel y col., 2019). Asimismo, la evaluación y validación de los diferentes métodos de diagnóstico en muestras de abortos y mortalidad neonatal es escasa (Ellis y col., 1995; Ridpath y col., 2009; Graham y col., 2009).

Las lesiones fetales atribuidas a la infección por el VDVB son muy variables y frecuentemente inespecíficas (Anderson, 2012). Las lesiones macroscópicas están caracterizadas por alteraciones congénitas a nivel del sistema nervioso, como hipoplasia cerebelar o hidrocefalia. Alopecia, hipoplasia del timo y lesiones oculares también han sido descritas (Grooms, 2004; Agerholm y col., 2015). La mayoría de los fetos abortados por el VDVB no presentan alteraciones microscópicas o las mismas son leves, caracterizadas por infiltrado inflamatorio mononuclear (Murray, 1991; Kirkbride, 1992). La autólisis tisular no solo afecta la eficacia de los métodos de diagnóstico, además puede enmascarar la presencia de lesiones asociadas al VDVB, perdiendo de este modo su valor diagnóstico (Kirkbride, 1992; Grooms, 2004).

La serología a partir de fluidos fetales puede ser una herramienta de detección indirecta de infección por el VDVB. La evaluación de anticuerpos en el feto depende de la edad gestacional y de las condiciones de conservación al momento del muestreo (Anderson, 2007). Las diferencias antigénicas significativas entre especies (VDVB-1 vs. VDVB-2) y entre subtipos del VDVB-1 (Nagai y col., 2001), conllevan a inadecuada respuesta inmunitaria si se aplican vacunas elaboradas a partir de subtipos que no se correspondan con los de mayor circulación en una región o país (Fulton y col., 2003a; Pecora y col., 2014). Al respecto, la presencia de anticuerpos neutralizantes a diferentes subtipos del VDVB en fluidos de cavidad aún no ha sido evaluada.

La elevada seroprevalencia del VDVB en Argentina (Odeón y col., 2001; Späth y Becker, 2012) y la detección de anticuerpos en fluidos fetales (Pinto y col., 1993; Muñoz y col., 1996; Moore y col., 2003) sugieren que los episodios de aborto en los que el VDVB está involucrado se presentan con mayor frecuencia a los diagnosticados habitualmente (Campero y col., 2003; Morrell y col., 2019). La detección del virus en muestras fetales, muchas veces en condiciones de obtención y conservación inadecuadas, exige la utilización de técnicas de diagnóstico más sensibles. Como alternativa o complemento a los métodos clásicos, que requieren de condiciones rigurosas en la calidad de la muestra, las técnicas moleculares contribuirían a la mejora del diagnóstico del VDVB en episodios de abortos.

Filogenia y filodinamia del virus de la diarrea viral bovina

El conocimiento de los tipos y subtipos del VDVB que circulan en determinada región o país es fundamental para establecer correctas herramientas de diagnóstico a emplear en programas de control (Ridpath, 2010; Weber y col., 2014). La ocurrencia de variaciones a nivel genómico puede generar consecuencias directas en la eficiencia de las pruebas diagnósticas, particularmente en las técnicas moleculares (Moenning y Becher, 2018). Por lo tanto, la estandarización de métodos diagnósticos con cepas endémicas o recientemente introducidas en una región es fundamental para el éxito de cualquier programa de control/erradicación (Ridpath, 2010; Moenning y Becher, 2018).

En la literatura hay disponible abundantes estudios filogenéticos del VDBV que ponen su foco en la identificación y tipificación de las cepas obtenidas. En Argentina, algunos trabajos han evaluado la variabilidad genética del VDVB (Jones y col., 2001, 2004; Pecora y col., 2014, 2019), en tanto que otros autores han descripto la circulación de subtipos del virus en casos clínicos o brotes de la enfermedad (Odeón y col., 2003; Craig y col., 2008, 2015; Juliá y col., 2009; González Altamiranda y col., 2012). Estos estudios demostraron que los subtipos 1a, 1b y 2b son los que circulan con mayor frecuencia en el país. No obstante, aún no hay datos del comportamiento evolutivo o de la dinámica poblacional del VDVB evaluados a través de estudios filodinámicos. La rápida diversificación de los genomas de ARN durante períodos de tiempo relativamente cortos permite inferir las relaciones filogenéticas en escala de tiempos que van de días hasta siglos (Pybus y Rambaut, 2009). En este sentido, es posible estimar la edad del ancestro común compartido por las secuencias analizadas y de esta manera conocer, por ejemplo, el momento de inicio de un brote o el momento de ingreso de una cepa o variante viral en un lugar o región determinado (Volz y col., 2013). A su vez, este proceso requiere de la estimación de la tasa de sustitución nucleotídica y de la construcción filogenética.

Los estudios filodinámicos permiten inferir propiedades epidemiológicas del virus como las fluctuaciones históricas de la dinámica poblacional (Drummond y col., 2005) o la

dispersión espacial de cepas ancestrales a sus ubicaciones contemporáneas en un área geográfica (Lemey y col., 2009). Estos estudios son informativos tanto desde una perspectiva evolutiva como desde el punto de vista del control de enfermedades (Volz y col., 2013). En este marco, disminuciones en la tasa de sustitución o en la diversidad poblacional podrían proveer evidencia del éxito en medidas de control implementadas como la vacunación o la búsqueda activa de infecciones (Volz y col., 2013). Por otra parte, provee información sobre la relación genética entre cepas, que pueden ser endémicas o recientemente introducidas en una región (Moenning y Becher, 2018).

Consideraciones finales

La optimización, estandarización y comparación de diversas técnicas de diagnóstico para el VDVB ha sido bien documentada a nivel internacional, especialmente para la identificación de animales PI (Walz y col., 2010). Sin embargo, no hay estudios en los que se comparen los métodos de diagnóstico AV, ELISAag, RT-PCR de punto final y RT-PCR en tiempo real en muestras de sueros y en un mismo estudio. Por otra parte, la evaluación de técnicas diagnósticas en muestras provenientes de abortos o mortalidad neonatal es escasa (Ellis y col., 1995; Graham y col., 2009; Ridpath y col., 2009). La detección del VDVB en fetos abortados puede ser importante para demostrar la presencia del agente en una explotación ganadera, lo que posteriormente justificaría la necesidad del muestreo de todos los individuos del rodeo con el fin de identificar y eliminar los animales PI (Larson y col., 2005a). Por lo tanto, la evaluación de fetos abortados o neonatos podría representar una herramienta de vigilancia epidemiológica práctica y económica para la identificación del VDVB en rodeos bovinos.

Este tipo de información, deficiente en nuestro país, es necesaria para el desarrollo y selección de técnicas diagnósticas rápidas, sencillas y de fácil aplicación para los laboratorios y a costos que permitan su uso en eventuales programas de control/erradicación. En el marco de este contexto, se destaca la importancia de mejorar la capacidad de diagnóstico del VDVB en el país. Para ello, en este trabajo de tesis se propone evaluar y comparar diferentes técnicas de detección del VDVB en muestras de sueros bovinos y en casos de abortos o muertes neonatales. Asimismo, se caracteriza genéticamente las cepas del VDVB obtenidas en esta tesis.

HIPÓTESIS

- 1) Las técnicas basadas en PCR tienen mejor desempeño que otros métodos virológicos para detectar al virus de la diarrea viral bovina en muestras de suero, de fetos abortados y de neonatos bovinos.
- 2) El subtipo 1b del virus de la diarrea viral bovina predomina en la región Pampeana, particularmente en la provincia de Buenos Aires.
- 3) Los subtipos del virus de la diarrea viral bovina que predominan en Argentina muestran diferencias en su evolución y dinámica poblacional.

OBJETIVOS

- 1) Adaptar y evaluar el uso de la técnica RT-PCR anidada y múltiple a las condiciones y sistema del laboratorio de trabajo para el diagnóstico del virus de la diarrea viral bovina en muestras de suero bovino y de fetos abortados y neonatos bovinos.
- 2) Comparar las técnicas de aislamiento viral, ELISA-luminométrico asistido por filtración, RT-PCR anidada y RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de suero bovino.
- 3) Comparar las técnicas de aislamiento viral, ELISA de captura de antígeno comercial, RT-PCR anidada y RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de fetos abortados/neonatos bovinos y su relación con los hallazgos patológicos y el título de anticuerpos neutralizantes en fluidos de cavidad.
- 4) Caracterizar genotípicamente las cepas del virus de la diarrea viral bovina detectadas en el estudio junto a las obtenidas por otras investigaciones en el país.

El desarrollo de la presente tesis está estructurado en cuatro Secciones de acuerdo con los Objetivos planteados.

MATERIALES y MÉTODOS

SECCIÓN 1:

Adaptación de la técnica RT-PCR anidada y múltiple a las condiciones y sistema del laboratorio de trabajo para la detección del VDVB en sueros y muestras fetales

Oligonucleótidos

Se emplearon los oligonucleótidos descritos por Gilbert y col. (1999) que amplifican una región del segmento genómico NS5B, el cual codifica para la enzima ARN-polimerasa ARN-dependiente (Neill, 2013). Los mismos fueron diseñados a partir de cepas de referencia y permiten la tipificación entre especies o tipos 1 y 2 del VDVB. Se utilizaron dos oligonucleótidos externos para la primera ronda de PCR [5'-AAGATCCACCCTTATGA(A/G)GC-3'] y [5'-AAGAAGCCATCATC(A/C)CCACA-3']. Mientras que en la segunda ronda de PCR se utilizaron tres oligonucleótidos internos: [5'-TGGAGATCTTTCACACAATAGC-3' (específico para VDVB-1), 5'-GGGAACCTAAGAACTAAATC-3' (específico para VDVB-2) y 5'-GCTGTTTCACCCAGTT(A/G)TA-3' (común para VDVB-1 y -2). Para la adaptación de la RT-PCR anidada y múltiple (RT-nPCR) se emplearon muestras de suero y de casos de abortos con infección natural por ambos tipos del virus, VDVB-1 y -2, obtenidas en el Laboratorio de Virología de la EEA INTA Balcarce.

Muestras de suero

Se utilizaron dos sueros provenientes de bovinos infectados persistentemente en forma natural por el VDVB-1a (título viral: $1 \times 10^{4.3}$ DICC₅₀/ml) y por el VDVB-1b (título viral: $1 \times 10^{3.57}$ DICC₅₀/ml). A partir del segundo suero mencionado se realizaron diluciones al décimo en suero ovino, previamente confirmado como negativo al VDVB por AV (Odeón y col., 2003) y RT-PCR de la región genómica 5'UTR (Vilcek y col., 1994) con modificaciones (González Altamiranda E., comunicación personal). Estas diluciones fueron empleadas para la puesta a punto de la técnica y para la comparación entre un método de extracción de ARN y el tratamiento térmico de la muestra sin extracción de ARN (ver "Comparación de un método de extracción de ARN y de tratamiento térmico sin extracción de ARN en muestras de suero").

Puesta a punto y optimización de la RT-PCR anidada y múltiple

En primera instancia se evaluaron las diferentes combinaciones posibles de concentraciones en la reacción de oligonucleótidos externos e internos (0,1; 0,3; 0,6 y 0,9 μM) y de Cl_2Mg (2; 4; 6 y 8 mM). Seguidamente se evaluaron diferentes combinaciones en la cantidad de ADN complementario (ADNc) (1,25 y 5 μl) y de producto de la 1^o ronda de PCR (1,25 y 2,5 μl). Para esto se utilizaron diluciones al décimo del suero de un bovino PI (título viral: $1 \times 10^{3,57}$ DICC₅₀/ml), de las cuales se extrajo ARN total con TRIzol[®] según indicaciones del fabricante, con modificaciones menores (ver “Comparación de un método de extracción de ARN y de tratamiento térmico sin extracción de ARN en muestras de suero”, inciso i: “Extracción de ARN con TRIzol[®]”).

El mayor límite de detección analítica se obtuvo utilizando 1,25 μl de ADNc y 2,5 μl de producto de PCR para un volumen final de reacción de 10 μl en la transcripción reversa y de 25 μl en la 1^o y 2^o ronda de PCR (Tabla 3).

Tabla 3: Combinaciones de ADN complementario y producto de la primera ronda de PCR

DICC ₅₀ /ml ^a	ADNc (μl)	Producto 1 ^o ronda PCR (μl)	Resultado ^b
3700			+++
370	1,25	2,5	+++
37			+
3,7			+
3700			+++
370	5	1,25	+
37			-
3,7			-
3700			++
370	5	2,5	+++
37			-
3,7			-

^adosis infectivas estimadas a partir de diluciones al décimo del suero de un animal PI con título viral de $1 \times 10^{3,57}$ ó 3700 DICC₅₀/ml.

^bestimación visual respecto a la banda observada en gel de agarosa del suero sin diluir (3700 DICC₅₀/ml).

Las condiciones de la RT-nPCR utilizada en el resto de los Objetivos fue la siguiente:

Retro-transcripción (RT): 4 μl de ARN; 0,3 μl (10 μM) de cada oligonucleótido externo (Gilbert y col., 1999) y 0,4 μl de DMSO se desnaturalizaron a 65 °C durante 5 min. Seguidamente se adicionó 0,5 μl (100 U) de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, USA); 0,5 μl de cada dNTP 10 mM (Promega, USA); 2,5 μl RT buffer (0,05 mM fosfato de potasio;

pH 7,2) y 1,5 µl agua libre de nucleasas. La mezcla (10 µl) se incubó a 37 °C por 50 min y a 70 °C por 5 min.

PCR (1º ronda de amplificación): La mezcla consistió en 5 µl 5X GoTaq® buffer (Promega, USA); 0,75 µl de cada oligonucleótido externo (10 µM); 0,5 µl dNTPs 10 mM (Promega, USA); 2,5 µl Cl₂Mg 25 mM (Promega, USA); 0,25 µl (1,25 U) GoTaq® ADN polimerasa (Promega, USA); 1,25 µl de ADNc y 14 µl de agua libre de nucleasas.

PCR (2º ronda de amplificación): La mezcla consistió en 5 µl 5X GoTaq® buffer (Promega, USA); 0,75 µl de cada oligonucleótido interno (10 µM); 0,5 µl dNTPs 10 mM (Promega, USA); 2,5 µl Cl₂Mg 25 mM (Promega, USA); 0,25 µl (1,25 U) GoTaq® ADN polimerasa (Promega, USA); 2,5 µl de producto de la 1º ronda y 12 µl de agua libre de nucleasas.

Las condiciones de ciclado para ambas rondas de PCR fue la siguiente: 1 min 94 °C; 25 ciclos de 1 min 94 °C, 1 min 50 °C y 2 min 72 °C; 15 min 72 °C. El tamaño esperado de los productos de PCR fue de 360 pb (VDVB-1) y 604 pb (VDVB-2) (Figura 1). Los productos obtenidos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR® Green (Invitrogen, USA).

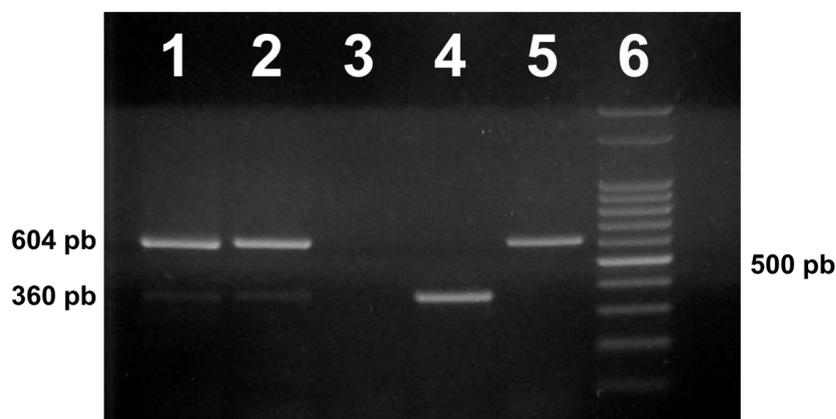


Figura 1: Tipificación del virus de la diarrea viral bovina por RT-PCR anidada y múltiple.

Calle 1 y 2: bazo y pulmón de un natimorto infectado con ambos tipos del VDVB, las bandas correspondientes al VDVB-1 se observan con menor nitidez; calle 3: control negativo; calle 4: cepa NADL (VDVB-1); calle 5: cepa VS253 (VDVB-2); calle 6: marcador de peso molecular.

Comparación de un método de extracción de ARN y de tratamiento térmico sin extracción de ARN en muestras de suero

Una vez seleccionado el protocolo de RT-nPCR se evaluó la factibilidad del método de extracción de ARN con TRIzol® (Invitrogen, USA) y del tratamiento térmico sin extracción de

ARN (Bachofen y col., 2013) en muestras de suero. Se utilizaron diluciones al décimo por triplicado del animal PI (título viral: $1 \times 10^{3,57}$ DICC₅₀/ml) previamente mencionado. Cada réplica se trató como una muestra independiente.

i) Extracción de ARN con TRIzol[®] según indicaciones del fabricante con modificaciones menores (González Altamiranda, 2013):

Paso 1 (homogenización): 250 μ l de suero se homogenizaron en 750 μ l de TRIzol[®] en tubos de 1,5 ml (libres de nucleasas) y se incubaron durante 5 a 10 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos.

Paso 2 (separación de fases): A cada muestra se le adicionó 150 μ l de cloroformo, se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Luego las muestras fueron centrifugadas a 12000 x g durante 15 min a 4 °C.

Paso 3 (precipitación del ARN): Luego del periodo de centrifugación se separó la fase acuosa (alrededor del 60% del volumen respecto al volumen de TRIzol[®]) de cada muestra y se transfirió a un nuevo tubo (libre de nucleasas) con 450 μ l de isopropanol. Se mezcló suavemente el contenido y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Luego las muestras fueron centrifugadas a 12000 x g durante 15 min a 4 °C.

Paso 4 (lavado del ARN): Luego del periodo de centrifugación, el sobrenadante de cada muestra fue descartado cuidadosamente y se le agregó a cada tubo 750 μ l de etanol 75%. Se homogenizaron las muestras invirtiendo suavemente los tubos y se centrifugaron a 7500 x g durante 5 min a 4 °C.

Paso 5 (restitución del ARN): Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y los tubos se dejaron secar en cámara de flujo de aire. El ARN se restituyó en 40 μ l de agua libre de nucleasas.

ii) Tratamiento térmico según Bachofen y col. (2013):

Se diluyeron 10 μ l de suero en 40 μ l de PBS (1:5) para ser sometido a 95 °C durante 3 min en termociclador. La muestra se colocó inmediatamente en hielo durante 5 min antes de emplearla directamente para la realización de RT-nPCR (4 μ l de la dilución 1:5 del suero en PBS).

En ambos métodos se cuantificó el ARN total por absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTeK, USA).

El límite de detección logrado con la RT-nPCR utilizando TRIzol[®] como método de extracción fue 3,7 DICC₅₀/ml (título viral $1 \times 10^{0,57}$) en dos ocasiones y de 37 DICC₅₀/ml (título viral $1 \times 10^{1,57}$) en una ocasión. En tanto que con el tratamiento térmico sin extracción de ARN (Bachofen y col., 2013) sólo se detectó el virus en el suero sin diluir (3700

DICC₅₀/ml) en las tres repeticiones. Por lo tanto, el método de extracción de ARN con TRIzol[®] fue empleado para el resto de las determinaciones del presente trabajo.

Sensibilidad analítica, especificidad analítica y efecto de la conformación de pools de sueros

La sensibilidad analítica o límite de detección se evaluó a partir de las diluciones seriadas del suero del animal PI previamente descrito y en tres momentos diferentes para contemplar la variabilidad inter-ensayo.

Para comprobar la especificidad de la RT-nPCR adaptada a las condiciones de nuestro laboratorio de trabajo se procesaron sobrenadantes de cepas de referencia del VDVB-1 y -2 (cepas NADL, Singer, VS253), bazo, pulmón, cerebro y fluidos de cavidad de fetos infectados naturalmente por diferentes agentes reproductivos (herpesvirus bovino, *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus*, *Leptospira* spp. y *Neospora caninum*), células MDBK, muestras de fetos bovinos y suero ovino negativos a la presencia del VDVB por AV y por RT-PCR de la región 5'UTR (Vilcek y col., 1994).

Para evaluar el efecto de la conformación de *pools* de sueros sobre la sensibilidad analítica y su aplicación en programas de saneamiento se mezcló el suero del animal PI (título viral $1 \times 10^{3,57}$) en iguales volúmenes de 4, 9, 19, 49 y 99 sueros negativos, simulando *pools* de 5, 10, 20, 50 y 100 sueros, respectivamente. Sobre cada uno se realizó extracción de ARN y la técnica de RT-nPCR en tres oportunidades. Con el fin de simular situaciones reales de saneamiento, los sueros negativos utilizados presentaron diferentes grados de hemólisis.

Detección del VDVB en programas de saneamiento y casos de diagnóstico

Con la técnica RT-nPCR previamente descrita se analizaron 2864 sueros bovinos, provenientes de 55 establecimientos ganaderos de la provincia de Buenos Aires (n = 52), Santa Fe (n = 2) y Córdoba (n = 1); 51 de ellos correspondieron a rodeos de producción de carne y 4 de producción lechera. En ninguno de los establecimientos se muestreó la totalidad de los animales existentes. El periodo de muestreo estuvo comprendido entre noviembre de 2015 y julio de 2019. Las muestras correspondieron a programas de control y a casos individuales en los que se consideró a DVB como diagnóstico presuntivo. Los sueros individuales fueron agrupados en *pools* de 5 a 10 y testeados por RT-nPCR. Las muestras individuales fueron testeadas nuevamente en los *pools* positivos a la detección del virus.

Muestras fetales

Para la adaptación de la RT-nPCR se utilizaron muestras de bazo, pulmón y cerebro provenientes de dos fetos abortados y de dos neonatos bovinos infectados en forma natural por el VDVB-1a, -1b y -2b.

Se utilizó el mismo método de extracción de ARN con TRIzol[®] descrito anteriormente para sueros, con la diferencia de que se homogenizaron aproximadamente 100 mg de tejido en 750 μ l de TRIzol[®] y el ARN se restituyó en 50 μ l de agua libre de nucleasas. Dado que elevadas concentraciones de ARN pueden inhibir la reacción de PCR (Pilkart y Villeponteau, 1993) se procedió a la cuantificación de este en los tres tejidos por absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTeK, USA), observándose los siguientes valores (Tabla 4):

Tabla 4: Cuantificación de ARN y relación 260/280 en bazo, pulmón y cerebro de dos fetos abortados y dos neonatos bovinos

Tejido^a	ng ARN/μl	Relación 260/280	ng ARN/100 mg tejido^b
Bazo (n = 4)	2893 \pm 244	1,3 \pm 0,13	144650 \pm 12192
Pulmón (n = 4)	1065 \pm 288	1,79 \pm 0,03	53225 \pm 14396
Cerebro (n = 4)	742 \pm 102	1,94 \pm 0,03	37100 \pm 5083

^a~100 mg de tejido utilizado para extracción de ARN.

^b estimado a partir de ng de ARN/ μ l * 50 μ l de agua utilizada para la reconstitución del ARN.

Las condiciones de la RT-nPCR fueron las mismas a las utilizadas con las muestras de sueros. Al realizar la técnica a partir del ARN sin diluir, muestras de bazo (calles 1, 5 y 12), pulmón (calle 2) y cerebro (calle 3) arrojaron resultados negativos o presencia de bandas inespecíficas (Figura 2). Por lo tanto, se procedió a diluir el ARN en agua libre de nucleasas para alcanzar concentraciones que no superen los 250-300 ng/ μ l. Se realizó nuevamente la técnica molecular, detectándose la región génica de interés en cada uno de tejidos de los cuatro casos.

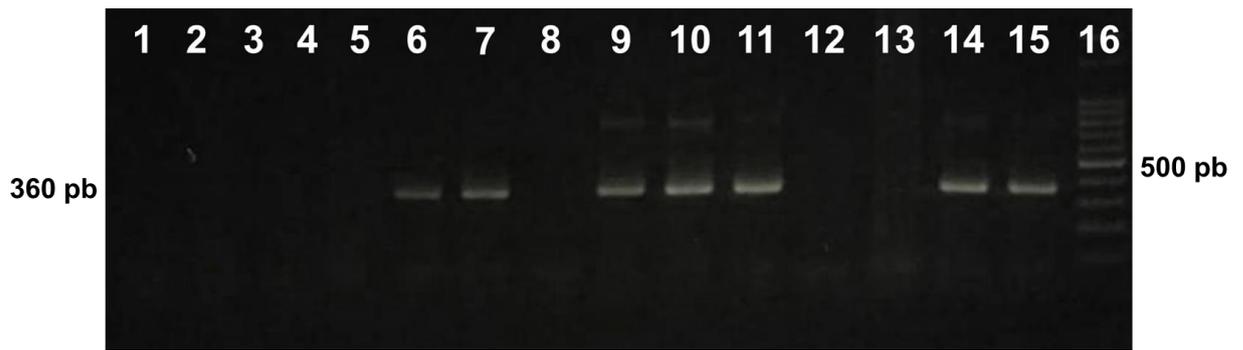


Figura 2: RT-PCR anidada y múltiple para la detección del virus de la diarrea viral bovina en tejidos de dos fetos abortados y dos neonatos bovinos infectados naturalmente. Calle 1-3: bazo, pulmón y cerebro de neonato bovino; calle 4: control negativo; calle 5-7: bazo, pulmón y cerebro de neonato bovino; calle 8: control negativo; calle 9-11: bazo, pulmón y cerebro de feto bovino abortado; calle 12: control negativo; calle 13-15: bazo, pulmón y cerebro de feto bovino abortado; calle 16: marcador de peso molecular.

SECCIÓN 2:

Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada, RT-PCR en tiempo real y ELISA luminométrico asistido por filtración para la detección del VDVB en muestras de suero bovino

Para comparar las técnicas diagnósticas se utilizaron 91 sueros bovinos. De estos, 31 pertenecían a los archivos del Laboratorio de Virología del Servicio de Diagnóstico Especializado (SDVE) INTA Balcarce y del Instituto de Virología de INTA Castelar. Los 60 sueros restantes fueron seleccionados de los casos de saneamiento y diagnóstico detallados anteriormente en la sección “Detección del VDVB en programas de saneamiento y casos de diagnóstico”.

Pruebas diagnósticas

Aislamiento viral

Se inocularon 50 µl de suero por triplicado sobre monocapa de células MDBK con 90% de confluencia en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) a una concentración de 50000 células/ml. Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ y se realizaron cuatro pasajes ciegos de células cada 48 h. La infección viral fue monitoreada diariamente por la presencia de efecto citopático (ecp) y la identificación viral se realizó mediante inmunofluorescencia directa con un antisuero policlonal conjugado (1:30) (VMRD Inc., USA) con microscopio de epifluorescencia utilizando un filtro para un rango de longitud de onda de 450-480 nm (Nikon Fluophot 126651).

ELISA luminométrico asistido por filtración

Cabe aclarar que el desarrollo de esta técnica no fue parte de las actividades de la presente tesis. La información que se detalla en este apartado fue brindada por la Dra. Alejandra Capozzo (Codirectora de la presente tesis).

Este método fue en principio desarrollado para detectar proteínas no estructurales del virus de la fiebre aftosa en lotes vacunales (Capozzo y col., 2010) y para la detección de inmunoglobulina M frente a *Piscirickettsia salmonis* en suero y mucus de salmones y truchas (Wilda y col., 2012). En base a estos antecedentes, en el Instituto de Virología del INTA Castelar se desarrolló un ELISA luminométrico asistido por filtración (FAL-ELISA) para identificar animales infectados por el VDVB, basado en la detección de la proteína viral no estructural NS3 del virus en suero.

Se utilizaron placas con base de filtro de polivinilideno fluoruro (PVDF) en la que se fijó un anticuerpo monoclonal anti-NS3 como captura. Las muestras de suero se filtraron por vacío a través de los pocillos (membrana de PVDF) donde el anticuerpo monoclonal retiene a la proteína NS3 mientras que todo resto de muestra se eluye, descartando los contaminantes que pueden interferir con las inmunoreacciones. La presencia de NS3 se reveló con anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa y quimioluminiscencia. La lectura, expresada en unidades relativas de luz (cRLU), se registró mediante un fotoluminómetro Berthold No. 10-6004 con el programa MikroWin 2000.

Los resultados previamente obtenidos permitieron ajustar la sensibilidad analítica de la técnica a 2 ng de NS3 por pocillo, independientemente del volumen de muestra y de la dilución del antígeno. La sensibilidad analítica fue también evaluada según el número de partículas virales (UFP) de la suspensión viral trabajando con infecciones de células de la línea MDBK, utilizando 100 µl de suspensión, evaluada en paralelo con un ELISA comercial (Priocheck BVDV Ag). Con el FAL-ELISA se obtuvo una sensibilidad 10 veces mayor respecto al ELISA comercial, considerando el mismo volumen de muestra (Figura 3).

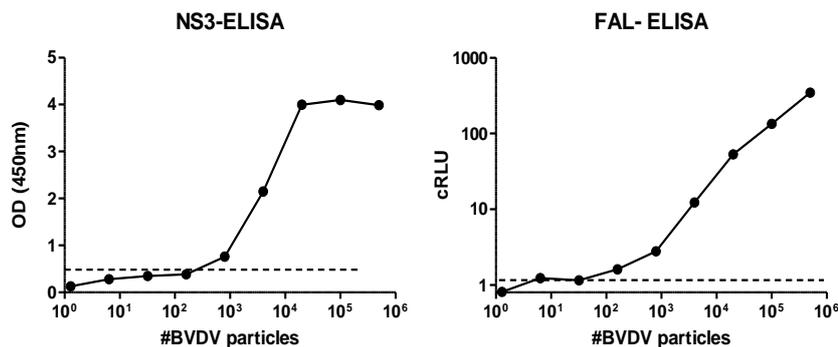


Figura 3: Evaluación de lisados de infección de células MDBK (100 µl por muestra) en NS3-ELISA (comercial, Priocheck BVDV Ag) y FAL-ELISA corregidas respecto del blanco. cRLU: unidades relativas de luz (Gentileza Dra. A. Capozzo).

Seguidamente se evaluaron muestras de suero bovino que resultaron negativos para anticuerpos contra el VDVB por seroneutralización pero positivos por RT-PCR (Vilcek y col., 1994). Estos animales fueron considerados como PI. Aquellos negativos por serología y por RT-PCR, se utilizaron como muestras negativas. Sobre un total de 26 muestras, fue posible clasificar positivas y negativas estableciendo un valor de cRLU de 2 (Figura 4).

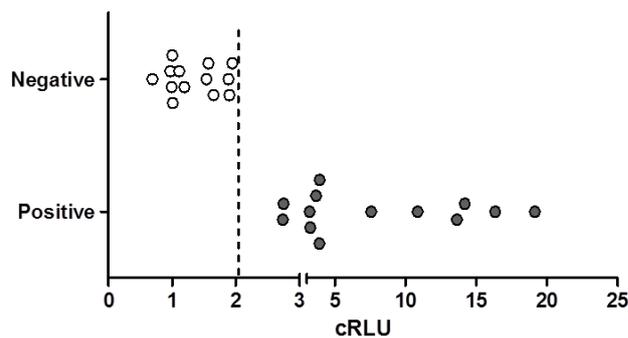


Figura 4: Evaluación de muestras positivas y negativas de sueros bovinos con FAL-ELISA (Gentileza Dra. A. Capozzo).

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron 100 µl de cada muestra de suero.

RT-PCR anidada y múltiple

La técnica empleada, adaptada de Gilbert y col. (1999), fue descrita en la Sección 1: “Puesta a punto y adaptación de la RT-PCR anidada y múltiple”.

RT-PCR en tiempo real

Retro-transcripción (RT): La síntesis de ADNc se efectuó utilizando los oligonucleótidos 324 y 326 (Vilcek y col., 1994) que amplifican un fragmento de 288 pb de la región 5’UTR. Para realizar la RT, 5 µl de ARN; 0,3 µl (20 µM) de cada oligonucleótido y 0,4 µl de DMSO se desnaturalizaron a 95 °C por 5 min. Seguidamente se adicionó 0,125 µl (25 U) de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, USA); 1 µl de dNTPs 10 mM (Promega, USA); 2 µl RT buffer (0,05 mM fosfato de potasio; pH 7,2) y 0,875 µl agua ultrapura. La mezcla (10,0 µl) se incubó a 37 °C por 50 min y a 70 °C por 5 min.

PCR en tiempo real (qPCR): Se utilizaron los oligonucleótidos Pesti-qF (5’-GATGCCATGTGGACGAGGGC-3’) y Pesti-qR (5’-CATGTGCCATGTACAGCAGAG-3’) descritos por Mari y col. (2016). Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 164 pb de la región 5’UTR y fueron diseñados para la detección de pestivirus (VDVB-1, VDVB-2, HoBi-like, virus de la peste porcina clásica y de la enfermedad ovina de la frontera). La reacción de qPCR se realizó por duplicado utilizando SYBR® green como fluorocromo intercalante. Se utilizaron 2 µl del producto de la reacción de RT en una concentración final de ~100 ng de ADNc, 5 µl de Master Mix (Invitrogen, USA), 1 µl (5 µM) de cada oligonucleótido en una concentración final de 300 nM y 1 µl de agua ultrapura para un volumen final de 10 µl. El perfil térmico utilizado fue el estándar para las reacciones de qPCR: 1 ciclo de 95 °C durante 10 min seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 seg y 60 °C

durante 1 min. Después del clicado se llevó a cabo una curva de disociación. La qPCR se realizó en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Se consideraron como positivas al VDVB aquellas muestras que mostraron una curva típica de amplificación y una temperatura de disociación (T_m) entre 80 y 82,5 °C. También se registraron los valores de ciclo umbral (C_q).

SECCIÓN 3:

Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada, RT-PCR en tiempo real y ELISA de captura de antígeno para la detección del VDVB en muestras de fetos abortados y neonatos bovinos

El estudio consistió en un análisis retrospectivo de casos de abortos y mortalidad neonatal de bovinos recibidos en el SDVE de la EEA INTA Balcarce. Se incluyeron 95 casos entre 1997 y 2018. La selección de los casos se basó en uno o más de los siguientes criterios: i) presencia de alteraciones patológicas compatibles con un agente infeccioso; ii) títulos de anticuerpos neutralizantes para el VDVB en fluidos y iii) antecedentes que permitan sospechar la presencia del virus (por ejemplo: malformaciones congénitas, alopecia, etc.). Las muestras estaban conservadas a -80 °C.

Se consideró aborto la expulsión de un feto no viable entre los 42 y 280 días de gestación; mientras que se consideraron como muertes neonatales aquellas ocurridas entre el nacimiento y los 28 días de vida. La edad fetal se estimó por la cobertura pilosa, peso y longitud desde la articulación atlanto-occipital hasta la primera vértebra dorsal (Campero y col., 2003) o fue proporcionada por el profesional actuante.

Pruebas diagnósticas

Aislamiento viral

Esta técnica se realizó en el momento de recepción de la muestra, periodo comprendido entre 1997-2018 según protocolos estandarizados del Laboratorio de Virología Animal, EEA INTA Balcarce. Las muestras de tejido se suspendieron y homogenizaron en medio Hank's, luego se centrifugaron a 5000 x g durante 5 min y se inocularon 30 µl del sobrenadante sobre monocapa de células MDBK siguiendo la metodología descrita para sueros (Odeón y col., 2003).

ELISA de captura de antígeno

Esta prueba se realizó durante el año 2018. Se utilizó un ELISA comercial (BIO K 337-Monoscreen Ag ELISA BVDV Bio-X Diagnostics, Belgium) para la detección de la proteína NS3 del VDVB según las instrucciones del fabricante. El *kit* está diseñado para su uso en homogenatos de tejido pulmonar o tejidos linfoides (<https://www.biox.com/en/bio-k-337-monoscreen-agelisa-bvdv-sandwich-double-wells-p-264/>). La densidad óptica (OD) de las muestras se midió utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. La OD neta de cada muestra y del control positivo se calculó restandole el OD del control

negativo que provee el *kit*. El valor de cada muestra se calculó con la siguiente fórmula: [valor % = (delta OD de la muestra / delta OD del control positivo) * 100. Según las indicaciones del fabricante, se consideró negativo o positivo cuando el valor de la muestra fue 7% mayor o menor respecto al control positivo.

RT-PCR anidada y múltiple

La técnica empleada, adaptada de Gilbert y col. (1999), fue descrita en la Sección 1: “Puesta a punto y optimización de la RT-PCR anidada y múltiple” y se realizó durante 2016-2018.

RT-PCR en tiempo real

La técnica empleada fue descrita en la Sección 2: “Comparación de AV, RT-PCR anidada y múltiple, RT-PCR en tiempo real y FAL-ELISA en muestras de suero bovino” y se realizó durante 2019.

Hallazgos patológicos

Se registraron las lesiones macroscópicas observadas en los casos positivos por al menos uno de los métodos evaluados. Asimismo, se evaluaron las lesiones histológicas en corazón, pulmones y cerebro. La severidad de estas se clasificó utilizando una valoración semicuantitativa basada en la proporción de tejido que mostró lesiones: 0 = ausencia de lesión; 1 = leve, 25% del tejido afectado; 2 = moderada, 25-50% del tejido afectado; 3 = severo, más del 50% del tejido afectado (Pérez y col., 2002).

Evaluación de la seroneutralización viral frente a los subtipos

-1a, -1b y -2b del VDVB en fluidos fetales

Se dispuso de 60 fluidos de cavidad, de los 95 casos evaluados, para realizar la SNT. La SNT se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por la OIE (2018) utilizando tres cepas citopáticas del VDVB aisladas en el laboratorio de Virología Animal de la EEA INTA Balcarce: VDVB-1a 13-558 (GenBank: MK558700), VDVB-1b 00-693 (GenBank: MK558701) y VDVB-2b 14-663 (GenBank: MK558702). Los fluidos fetales se centrifugaron por 5 min a 7500 x g y fueron inactivados por 30 min a 56 °C. Luego se realizaron diluciones seriadas en base 2 (1:4 a 1:32) en MEM a las que se les adicionó 100 TCID₅₀ de virus. Posteriormente se incubaron en placas de 96 pocillos durante 60 min en estufa a 37 °C con 5% CO₂. Después de la incubación se agregaron 2 x 10⁴ de células MDBK por cada pocillo y se incubaron las placas durante 72 h a 37 °C en una atmósfera con 5% CO₂. La dilución más elevada capaz de inhibir en un 50% el efecto citopático del virus fue registrada por tres

operarios diferentes. Las muestras que no mostraron efecto citopático en la dilución 1:32 fueron testeadas nuevamente en diluciones desde 1:4 a 1:512.

El título de anticuerpos neutralizantes (AcN) para cada virus y cada operador fue convertido a log₂ de acuerdo con el método de Spearman-Kärber (Lennette, 1969). La lectura registrada por los tres operarios se unificó y expresó como media geométrica por cada uno de los tres virus evaluados. Se consideraron positivas aquellas muestras con títulos de AcN iguales o superiores a 2 (dilución 1:4).

Para determinar si la respuesta serológica fue específica frente a alguno de los tres subtipos del VDVB evaluados, se utilizó la siguiente ecuación en las muestras positivas a títulos de AcN (Bauermann y col., 2017; Pecora y col., 2017):

$$R_{\text{subtipoX}} = (3 \times \text{título frente al subtipo X}) / (\text{título frente al subtipo X} + \text{título frente al subtipo Y} + \text{título frente al subtipo Z})$$

Donde X, Y o Z corresponde a VDVB-1a, -1b o -2b.

Si el valor R para un virus fue mayor a 0,2 respecto al valor R de los otros dos virus se consideró que la respuesta serológica correspondió a ese virus. En tanto que un valor R menor a 0,2 se consideró sin título de AcN predominante o ambiguo (Bauermann y col., 2017; Pecora y col., 2017).

SECCIÓN 4:

Caracterización genotípica de las cepas del VDVB identificadas durante el estudio

RT-PCR para la región 5'UTR del genoma del VDVB

Para el estudio filogenético se utilizaron un total de 43 secuencias nucleotídicas, 41 de la región 5'UTR (10 de sueros y 31 de muestras fetales) y 2 de la región NS5B (1 de suero y 1 de muestra fetal) del VDVB. En los casos de saneamiento en los que se detectó más de un suero, sólo se realizó el análisis de secuenciación de una muestra. Las secuencias en los casos de abortos fueron obtenidas de una muestra por cada caso.

Secuenciación y análisis filogenético

Los productos de PCR obtenidos de las regiones 5'UTR y NS5B fueron purificados con el *kit* comercial Illustra™ ExoProStar™ (GE Healthcare Life Sciences, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los amplicones fueron secuenciados en ambas direcciones utilizando los oligonucleótidos 324 y 326 para la región 5'UTR (Vilcek y col., 1994) y los oligonucleótidos internos específicos de especie o tipo del VDVB para la región NS5B (Gilbert y col., 1999). La secuenciación fue realizada en la Unidad de Genómica Básica (Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar). Se utilizó el método de Sanger en electroforesis capilar mediante un protocolo modificado de Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa Chromas (v2.33, Technelisyum Pty Ltd.) y se ensamblaron con BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999). Las secuencias se tipificaron mediante la herramienta BLAST de National Center for Biotechnology Information (NCBI; Altschul y col., 1990) y mediante análisis filogenético con secuencias representativas de diferentes subtipos del VDVB obtenidos de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias se alinearon con el programa ClustalW (Thompson y col., 1994) implementado en MEGA v7.0.26 usando los parámetros por defecto (Kumar y col., 2016). Los análisis filogenéticos y la reconstrucción de los árboles se realizaron en MEGA v7.0.26, utilizando el algoritmo de distancias de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) y el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura-2 parámetros. La confiabilidad de los árboles reconstruidos fue evaluada mediante *bootstrap* con 1000 réplicas.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas en este estudio fueron depositadas en la base de datos de GenBank (Tabla A1, Anexo).

Identities por pares de las secuencias nucleotídicas del fragmento 5'UTR

Para calcular las identidades por pares de los nucleótidos del fragmento 5'UTR obtenidas en esta tesis se utilizó el programa Sequence Demarcation Tool v1.2 (SDT; Muhire y col., 2014) realizando los alineamientos mediante ClustalW (Thompson y col., 1994) con los parámetros preestablecidos. Se calcularon las identidades por pares incorporando secuencias de Argentina disponibles en Genbank de los subtipos -1a (n = 31), -1b (n = 65) y -2b (n = 8) (Tabla A2, Anexo).

Análisis filodinámico del fragmento 5'UTR

Para este análisis se utilizaron las secuencias obtenidas en esta tesis, junto con secuencias de cepas argentinas del VDVB obtenidas de GenBank. La distribución temporal de muestreo puede influenciar la inferencia de la dinámica poblacional (Stack y col., 2010). En el caso de VDVB-1b, se dispuso de 105 secuencias, promedio de 4,6 secuencias/año, de las cuáles 35 correspondían a 2014. Para evitar un posible sesgo de muestreo, se realizó un submuestreo de 5 secuencias del año 2014, totalizando 79 secuencias. El conjunto de 105 secuencias mostró resultados similares (Tabla A3 y Tabla A4, Anexo) al conjunto de 79 secuencias, pero presentó saturación de las sustituciones al graficar las transiciones y transversiones vs. la distancia genética (Figura A1, Anexo). Por lo tanto, los resultados del VDVB-1b son presentados utilizando el conjunto de 79 secuencias.

De esta manera, quedaron conformados tres conjuntos de secuencias del fragmento 5'UTR: VDVB-1a: 45 secuencias obtenidas de 1988 a 2018, provenientes de las provincias Buenos Aires (n = 30), Córdoba (n = 1), Corrientes (n = 3), Santa Cruz (n = 5), sin dato (n = 6); VDVB-1b: 79 secuencias obtenidas de 1984 a 2019, provenientes de las provincias Buenos Aires (n = 71), Corrientes (n = 1), Santa Fe (n = 2), sin dato (n = 5) y VDVB-2: 20 secuencias obtenidas de 1991 a 2014, provenientes de las provincias Buenos Aires (n = 12), Corrientes (n = 1), Santa Fe (n = 1), sin dato (n = 6) (Tabla A5, Anexo). La metodología descrita a continuación se realizó en los tres conjuntos de secuencias nucleotídicas.

Las secuencias se alinearon mediante ClustalW (Thompson y col., 1994) con los parámetros preestablecidos y se editaron manualmente con el programa MEGA v7.0.26 (Kumar y col., 2016).

En un conjunto de secuencias, usualmente la tasa de transiciones ($A \leftrightarrow G$; $C \leftrightarrow T$) es mayor que la tasa de transversiones ($A \text{ o } G \leftrightarrow C \text{ o } T$). Por lo tanto, al graficar el número de transiciones y transversiones vs. la divergencia de las secuencias, ambas tasas deberían aumentar linealmente con la distancia genética, siendo las transiciones mayores que las transversiones. Sin embargo, al aumentar la distancia genética (tiempo evolutivo), eventualmente el número de transversiones superará al de transiciones llegando a una saturación de las sustituciones (Salemi, 2009). Cuando la saturación es alcanzada, hay

pérdida de señal filogenética y las secuencias ya no son informativas para evaluar procesos evolutivos (Xia y col., 2003). Para verificar esta situación se graficó la distribución de las transiciones y transversiones vs. la distancia genética. Además, se calculó el índice de saturación de sustituciones (Iss) y su valor crítico (Iss.c) mediante la prueba propuesta por Xia y col. (2003). En un conjunto de secuencias sin saturación, el Iss es significativamente menor al Iss.c. Ambos métodos se realizaron con el programa DAMBE v7.2.102 (Xia, 2018).

La presencia de recombinación se evaluó utilizando los cinco métodos seleccionados por defecto en el programa RDP v4.100 (Martin y col., 2015). Se fijó un nivel de significancia del 1% considerando el método de corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Sólo se consideraron los eventos de recombinación detectados por al menos tres métodos.

La señal filogenética se exploró con el método de mapeo de verosimilitud (*likelihood mapping*) mediante la generación de 10000 cuartetos aleatorios de secuencias en IQ-TREE v1.6.12 (Nguyen y col., 2015). Un mapa de verosimilitud consiste en un triángulo equilátero que contiene puntos que representan las probabilidades de los tres posibles árboles sin raíz para un conjunto de cuatro secuencias (cuartetos) seleccionadas al azar del conjunto de datos: los puntos cerca de las esquinas representan filogenias *tree-like* (totalmente resueltas en las que un árbol es claramente mejor que los otros); los puntos en los tres lados representan filogenias *network-like* (no es posible decidir entre dos topologías) y los puntos en el área central del mapa representan una señal filogenética *star-like*. Se considera que el conjunto de datos tiene señal filogenética *star-like* cuándo más del 33% de los puntos están en el centro del triángulo (Strimmer y von Haeseler, 1997).

El modelo de sustitución nucleotídica se infirió con el Criterio de Información Bayesiano (BIC) utilizando el programa ModelFinder (Kalyaanamoorthy y col., 2017) en IQ-TREE v1.6.12 (Nguyen y col., 2015). El modelo seleccionado para ambos conjuntos de secuencias fue Kimura 2 parámetros y distribución gamma (K2P+G). La inferencia filogenética se realizó por el método de máxima verosimilitud en IQ-TREE v1.6.12. La confiabilidad de los árboles se evaluó por *SH-like approximate likelihood ratio* (SH-aLRT, 1000 réplicas) (Guindon y col., 2010) y *Ultrafast Bootstrap* (UFboot, 1000 réplicas) (Minh y col., 2013), considerando clados confiables a aquellos que presentaron SH-aLRT $\geq 80\%$ y UFboot $\geq 95\%$. Los árboles se visualizaron con el programa FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

La presencia de estructura temporal (reloj molecular) se evaluó mediante un enfoque basado en la regresión de la divergencia genética (*root-to-tip genetic distance*) vs. la fecha de muestreo con el programa TempEst v1.5.3 (Rambaut y col., 2016). Los conjuntos de secuencias que contienen estructura temporal presentan una correlación positiva entre divergencia genética y fecha de muestreo. Las secuencias que no contienen estructura

temporal no son apropiadas para inferencias filogenéticas usando reloj molecular (Rambaut y col., 2016).

La edad o tiempo del ancestro común más reciente (tMRCA), la tasa de sustituciones/sitio/año (s/s/a) y el modelo demográfico se estimaron utilizando la aproximación bayesiana con el paquete BEAST v1.10.4 (Suchard y col., 2018) en el servidor CIPRES Science Gateway (Miller y col., 2010). El análisis constó de una corrida con un largo de $3-4 \times 10^8$ cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC) según la matriz de secuencias. Se compararon modelos de reloj molecular estricto y relajado (*uncorrelated log-normal*) junto con modelos demográficos paramétricos (población constante y crecimiento exponencial) y no paramétricos (*GMRF Bayesian Skyride* y *Bayesian Skyline*). La convergencia de las corridas se analizó con el programa Tracer v1.7.1 (<http://beast.community/tracer>) considerando 10% de *burn-in* y solo se aceptaron los parámetros con valores de tamaño efectivo de muestreo iguales o superiores a 200. La incertidumbre en las estimaciones de los parámetros se evaluó mediante la distribución de la probabilidad posterior 95% (*highest posterior density* 95%, HPD95%). El modelo que mejor ajustó para cada una de las matrices se seleccionó mediante el cálculo del Factor de Bayes usando las verosimilitudes marginales estimadas por los métodos *path sampling* y *stepping stone* (Baele y col., 2012, 2013) con el paquete BEAST v1.10.4. Según lo propuesto por Kass y Raftery (1995), se consideraron significativos los valores $2\ln BF$ iguales o superiores a 6.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La proporción de casos positivos para cada técnica se expresó como porcentaje y fueron comparadas mediante la prueba Q de Cochran y la prueba de Mc Nemar (Proc FREQ, SAS Studio v3.6, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Cuando fue necesario, las comparaciones múltiples se ajustaron mediante el método de Bonferroni.

La sensibilidad (Se) y especificidad (Es) de las técnicas se estimaron considerando al AV como prueba de referencia.

La concordancia entre las técnicas se evaluó a través del porcentaje de acuerdo positivo y negativo ($\%_{\text{pos}}$ y $\%_{\text{neg}}$; Cicchetti y Feinstein, 1990) y del coeficiente de Gwet (AC1; Gwet, 2008) (“rel” package v1.3.3, R v3.5.1, R Core Team 2018, Vienna, Austria). La interpretación del nivel de concordancia se expresó según McHugh (2012).

En la Sección 3, la edad de los animales en los casos de pérdidas reproductivas fue analizada mediante el método de Chi cuadrado para homogeneidad de proporciones (Proc FREQ, SAS). La proporción de tejidos con lesiones histológicas fue analizada mediante la prueba Q de Cochran, mientras que la severidad fue analizada con prueba Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. El título de AcN en fluidos de cavidad frente a cada subtipo del VDVB evaluado se comparó mediante la prueba de Friedman (Proc FREQ, SAS) considerando un nivel de significancia del 5%.

En todos los casos el intervalo de confianza al 95% (IC_{95%}) se estimó por el método de razón de verosimilitud y se consideró un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

SECCIÓN 1:

Adaptación de la técnica RT-PCR anidada a las condiciones y sistema del laboratorio de trabajo para la detección del VDVB en sueros y muestras fetales

Puesta a punto y adaptación de la RT-PCR anidada y múltiple

Dado que la técnica fue necesaria para el desarrollo del resto de los Objetivos, los resultados obtenidos en este punto fueron detallados en el apartado “Puesta a punto y adaptación de la RT-PCR anidada y múltiple” de la Sección 1 de Materiales y Métodos.

Sensibilidad analítica, especificidad analítica y efecto de la conformación de *pools* de sueros

Con la RT-nPCR se detectaron cepas de referencia y locales correspondientes a los subtipos -1a, -1b, -2a y -2b del VDVB descritos en el país y a partir de diferentes matrices (sobrenadantes de cultivo celular, sueros y tejidos). No se observaron amplificaciones inespecíficas en casos de abortos causados por diversos agentes y en suero ovino libre de VDVB utilizado como control. En el análisis de 2864 sueros y más de 100 casos de pérdidas reproductivas, los controles de extracción y de reacción positivos (suero de animal PI individual o en *pool* con otros sueros, tejidos fetales infectados naturalmente por el VDVB) y negativos (suero ovino, tejidos fetales negativos al VDVB) empleados rutinariamente arrojaron los resultados esperados.

Los *pools* conformados con suero de un bovino PI (título viral $1 \times 10^{3,57}$) en 4, 9, 19, 49 o 99 sueros bovinos negativos al VDVB resultaron positivos con la RT-nPCR en las tres repeticiones efectuadas, lo que representó una sensibilidad analítica de al menos $1 \times 10^{1,57}$ DICC₅₀/ml.

Detección del virus de la diarrea viral bovina en programas de saneamiento y casos de diagnóstico

En el periodo comprendido entre noviembre de 2015 y julio de 2019 se analizaron por RT-nPCR 2864 sueros bovinos (Tabla 5).

Tabla 5: Detección del virus de la diarrea viral bovina en *pools* y muestras individuales de suero bovino por RT-nPCR^a

	Sueros analizados	Pools analizados	Pools positivos	Sueros positivos	Rodeos analizados	Rodeos positivos
Muestras en <i>pools</i>	2791	412	10	16	22	2
Muestras individuales	73	-	-	13	33	9
Total	2864	412	10 (2,4%)	29 (1%)	55	11 (20%)

^a nested RT-PCR (Gilbert y col., 1999)

De los 29 sueros positivos, 13 provenían de animales de 3 meses de edad, 13 de animales entre 6 y 18 meses de edad, mientras que los 3 sueros restantes pertenecían a 3 vacas. En todas las muestras positivas se amplificó un fragmento de 360 pb correspondiente al VDVB-1 de acuerdo con los oligonucleótidos diseñados por Gilbert y col. (1999).

De los 55 rodeos muestreados, 11 (20%) presentaron al menos 1 animal positivo al VDVB; 10 establecimientos de producción de carne y 1 establecimiento de producción lechera (Figura 5; Tabla A6, Anexo). Se detectó al virus en el 46% (6/13) de los rodeos que presentaron problemas sanitarios compatibles con DVB. Por otra parte, el virus fue detectado en el 27% (3/11) de los rodeos con sospecha de DVB, pero sin signología registrada. No hubo información disponible respecto a la presencia o ausencia de signos clínicos en los 31 rodeos restantes, de los cuales 2 fueron positivos a la presencia del VDVB (Tabla A6, Anexo).

En ningún caso se realizó un segundo muestreo debido a la falta de respuesta del profesional actuante y por venta o muerte de los animales positivos al VDVB. En consecuencia, no fue posible la confirmación del estado de infección persistente en los individuos positivos.

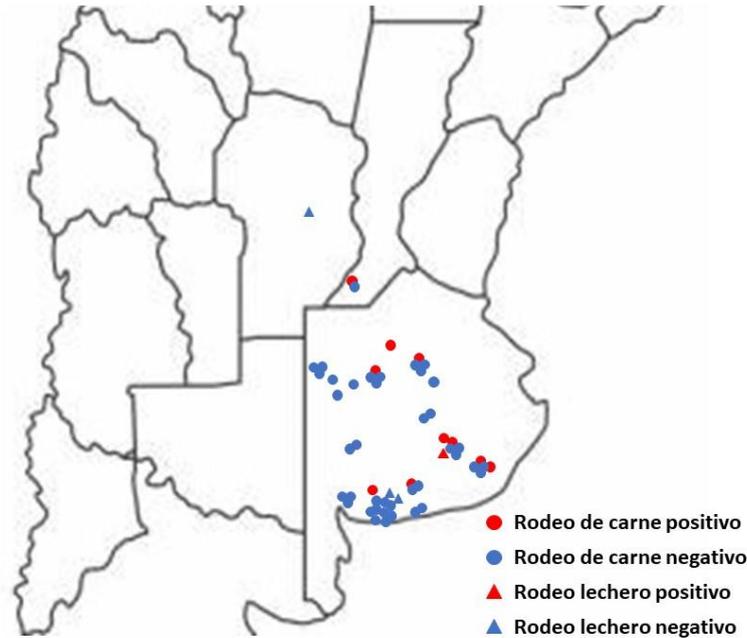


Figura 5: Distribución espacial de los establecimientos muestreados para la detección del virus de la diarrea viral bovina por RT-nPCR en suero.

Muestras fetales

En el caso de especímenes provenientes de fetos abortados, se utilizó la misma RT-nPCR empleada para las muestras de suero. Con el fin de evitar bandas inespecíficas o falsos negativos por inhibición de la reacción se fijó un límite máximo de 1000-1200 ng de ARN en la reacción total, equivalente a 250-300 ng ARN/ μ l. Para más detalles ver el apartado “Muestras fetales” en la Sección 1 de Materiales y Métodos.

SECCIÓN 2:

Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada, RT-PCR en tiempo real y ELISA luminométrico asistido por filtración para la detección del VDVB en muestras de suero bovino

De los 91 sueros seleccionados, 49 resultaron positivos a al menos una de las técnicas evaluadas. Todas las cepas detectadas por AV correspondieron al biotipo ncp (Tabla 6).

Se observó discrepancia entre FAL-ELISA y los métodos moleculares en 14 sueros, los cuales resultaron positivos a la detección del antígeno viral pero negativos a la detección del ARN (Tabla 6).

Los valores de Cq obtenidos mediante RT-qPCR fueron de 21,4 a 34,7 (promedio de 21,4) en muestras con AV, en tanto que el Cq fue de 24 a 34,7 (promedio de 29,3) para las muestras negativas al AV (Tabla 6).

Tabla 6: Sueros bovinos positivos al virus de la diarrea viral bovina (n = 49)

Suero	AV / biotipo	FAL-ELISA	RT-nPCR	RT-qPCR resultado	Cq
1	-	+	-	-	nd
2	-	+	+	-	nd
3	-	+	-	-	nd
4	-	+	+	+	30,7
5	-	+	-	-	nd
6	+ / ncp	+	+	+	26,9
7	+ / ncp	+	+	+	26,1
8	+ / ncp	+	+	+	26,7
9	-	+	-	+	34,7
10	-	+	-	-	nd
11	+ / ncp	+	+	+	25,3
12	+ / ncp	+	+	+	29,6
13	+ / ncp	+	+	+	27,5
14	-	+	-	-	nd
15	+ / ncp	+	+	+	27,1
16	+ / ncp	+	+	+	31,8
17	+ / ncp	+	+	+	27
18	+ / ncp	+	-	+	33,7
19	-	+	-	-	nd
20	+ / ncp	+	+	+	29,6

Cq: valor de ciclo umbral; nd: no determinado

Tabla 6 (continuación): Sueros bovinos positivos al virus de la diarrea viral bovina (n = 49)

Suero	AV / biotipo	FAL-ELISA	RT-nPCR	RT-qPCR	
				resultado	Cq
21	+ / ncp	+	+	+	28,8
22	+ / ncp	+	+	+	26,4
23	+ / ncp	+	+	+	24
24	-	+	-	-	nd
25	-	+	+	+	25,9
26	+ / ncp	+	+	+	24,6
27	+ / ncp	+	+	+	29,3
28	-	+	-	-	nd
29	-	+	+	+	34,6
30	+ / ncp	+	+	+	27,9
31	-	+	-	-	nd
32	+ / ncp	+	+	+	29,1
33	+ / ncp	+	+	+	23,2
34	+ / ncp	-	+	+	25,9
35	+ / ncp	+	+	+	27,7
36	+ / ncp	-	+	+	26,4
37	-	+	-	-	nd
38	-	+	-	-	nd
39	+ / ncp	+	+	+	23,4
40	+ / ncp	+	+	+	21,4
41	-	+	+	+	33,4
42	+ / ncp	+	+	+	31,8
43	-	+	-	+	33,2
44	-	+	-	-	nd
45	-	+	-	-	nd
46	-	+	-	-	nd
47	+ / ncp	+	+	+	25,7
48	+ / ncp	-	+	+	30
49	-	-	+	+	33,1

Cq: valor de ciclo umbral; nd: no determinado

La proporción de sueros positivos al VDVB fue significativamente mayor por FAL-ELISA respecto a AV ($p < 0,01$) y a RT-nPCR ($p = 0,03$), pero no difirió de RT-qPCR ($p = 0,07$). Mientras que la proporción de positivos por AV fue menor respecto a RT-qPCR ($p = 0,049$) y no difirió de RT-nPCR ($p = 0,35$). No existieron diferencias estadísticas entre ambas técnicas moleculares ($p > 0,99$) (Tabla 7).

Tabla 7: Proporción de sueros bovinos positivos al virus de la diarrea viral bovina según la técnica empleada (n = 91)

Técnica	Casos positivos al VDVB		
	N	Proporción (%)*	IC _{95%}
AV	27	29,7 ^a	20,9 - 39,5
FAL-ELISA	45	49,5 ^b	39,3 - 59,6
RT-nPCR	32	35,2 ^{ac}	25,9 - 45,3
RT-qPCR	34	37,4 ^{bc}	27,9 - 47,6

*Proporciones con superíndices diferentes difieren significativamente ($p < 0,05$ - Ajuste de Bonferroni).

La Se y Es estimadas empleando al AV como prueba de referencia se detalla en la Tabla 8. Vale aclarar que la técnica de AV se realizó en el momento de la recepción de las muestras, entre 2009 y 2019, pero no se repitió posteriormente y en paralelo con el resto de los métodos evaluados. En contraste a la mayor proporción de muestras positivas detectadas por FAL-ELISA (Tabla 7), el nivel de Se fue levemente superior para ambas técnicas moleculares, mientras que se observó una menor Es del FAL-ELISA en comparación a RT-nPCR y RT-qPCR.

Tabla 8: Sensibilidad y especificidad de las técnicas FAL-ELISA, RT-nPCR y RT-qPCR para la detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de sueros bovinos considerando al AV como prueba de referencia (n = 91)

Técnica	Sensibilidad		Especificidad	
	%	IC _{95%}	%	IC _{95%}
FAL-ELISA	88,9	73,7 - 97,1	67,2	55,2 - 77,9
RT-nPCR	96,3	84,7 - 99,8	90,6	81,9 - 96,2
RT-qPCR	100	93,1 - 100	89,1	79,9 - 95,2

El porcentaje de acuerdo y el coeficiente AC1 entre las técnicas diagnósticas evaluadas en muestras de suero se muestra en la Tabla 9. El %_{neg} fue alto (promedio de 87%) en todas las comparaciones. Por otra parte, el %_{pos} fue alto (promedio de 90%) para las comparaciones que no incluyeron a FAL-ELISA, en tanto que fue moderado (promedio de 72%) cuando esta técnica fue incluida en las comparaciones.

En correspondencia con los valores obtenidos de %_{neg} y %_{pos}, la concordancia evaluada a través del coeficiente AC1 fue débil en las comparaciones que incluyeron a FAL-

ELISA, pero fuerte a casi perfecta para el resto de las comparaciones. Los mayores porcentajes de acuerdo y concordancia se obtuvieron al comparar ambas técnicas moleculares.

Tabla 9: Porcentaje de acuerdo y concordancia entre AV, FAL-ELISA, RT-nPCR y RT-qPCR para la detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de sueros bovinos (n = 91)

Técnicas	Porcentaje de acuerdo ^a			Coeficiente de Gwet ^b	
	Negativo	Positivo	AC1	IC _{95%}	Concordancia ^c
AV vs. FAL-ELISA	78,2	66,7	0,49	0,31 - 0,68	Mínima a moderada
AV vs. RT-nPCR	94,3	88,1	0,86	0,76 - 0,96	Moderada a casi perfecta
AV vs. RT-qPCR	94,2	88,5	0,86	0,76 - 0,96	Moderada a casi perfecta
FAL-ELISA vs. RT-nPCR	80	72,7	0,55	0,37 - 0,72	Mínima a moderada
FAL-ELISA vs. RT-qPCR	81,6	75,9	0,59	0,42 - 0,76	Débil a moderada
RT-nPCR vs. RT-qPCR	96,6	93,9	0,92	0,84 - 1	Fuerte a casi perfecta

^aCichetti y Feinstein (1990); ^bGwet (2008); ^cInterpretación según McHugh (2012)

SECCIÓN 3:

Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada, RT-PCR en tiempo real y ELISA de captura de antígeno para la detección del VDVB en muestras de fetos abortados y neonatos bovinos

De los 95 casos seleccionados, 40 resultaron positivos a al menos una de las técnicas evaluadas (Tabla 10). Los casos provenían de rodeos de la provincia de Buenos Aires (n = 36) y Córdoba (n = 1) (Figura 6); en tres casos no se conoció la ubicación geográfica del establecimiento.



Figura 6: Distribución espacial de los establecimientos con casos de aborto/mortalidad neonatal positivos al virus de la diarrea viral bovina por RT-nPCR.

El VDVB fue detectado con mayor frecuencia en fetos del 3º trimestre de gestación (n = 24; 64,9%, CI_{95%} = 48,9 - 78,9) que en los del 1º (n = 3; 8,1%, CI_{95%} = 2,1 - 19,7) y 2º trimestre (n = 5; 13,5%, CI_{95%} = 5,1 - 26,8), así como en neonatos (n = 5; 13,5%, CI_{95%} = 5,1 - 26,8) (p < 0,01).

De los 28 casos detectados por AV, en 27 se aisló el biotipo ncp (96,4%) y en sólo 1 caso se aisló al biotipo cp (3,6%).

Se observó discrepancia entre ambas técnicas de RT-PCR en 15 casos (Tabla 10), 11 muestras fueron negativas por RT-nPCR pero positivas a RT-qPCR, mientras que en las 4 restantes se observó lo opuesto.

Los valores de Cq obtenidos mediante RT-qPCR fueron de 19,1 a 36,4 (promedio de 25,9) en muestras con AV, en tanto que el Cq fue de 21,2 a 37,4 (promedio de 33,7) para las muestras negativas al AV (Tabla 10).

Tabla 10: Muestras de fetos abortados y neonatos bovino positivas al virus de la diarrea viral bovina (n = 40)

Caso	Edad gestacional	Muestra	AV / biotipo	ELISAag	RT-nPCR	RT-qPCR resultado	Cq	Alteraciones patológicas
97-097	1º trimestre	bazo	+ / ncp	-	-	-	nd	sin dato
98-096	1º trimestre	bazo	+ / ncp	-	-	-	nd	sin dato
98-204	3º trimestre	bazo	+ / ncp	+	+	+	25,8	no
98-530	3º trimestre	linfonódulo	+ / ncp	+	-	+	24,5	sin dato
99-535	3º trimestre	bazo	+ / ncp	+	+	+	27,5	no
04-558	3º trimestre	bazo	+ / ncp	-	-	+	25	si
04-567	sin dato	bazo	+ / ncp	-	-	+	23,2	no
04-619	2º trimestre	bazo	+ / ncp	-	-	+	24,2	si
04-725	3º trimestre	bazo	+ / ncp	-	+	+	26,4	si
04-749	neonato	bazo	+ / ncp	-	+	+	22,8	no
05-1151	3º trimestre	bazo	+ / ncp	-	+	-	nd	no
07-509	3º trimestre	bazo	+ / ncp	+	+	-	nd	sin dato
08-244	sin dato	pulmón	+ / ncp	-	-	+	36,4	sin dato
08-538	3º trimestre	bazo	+ / ncp	-	+	+	19,9	sin dato
08-546	2º trimestre	bazo	+ / ncp	-	+	+	23,2	si
08-724	3º trimestre	bazo	+ / ncp	+	+	+	29,3	sin dato
09-617	sin dato	bazo	+ / ncp	-	+	+	36	sin dato
09-688	1º trimestre	bazo	+ / ncp	-	-	-	nd	si
10-405	3º trimestre	bazo	-	-	+	+	33,4	si
10-284	3º trimestre	bazo	-	-	-	+	37,4	si
10-381	3º trimestre	bazo	-	-	-	+	35,4	si
10-430	3º trimestre	bazo	+ / ncp	+	+	+	22,8	si
10-636	3º trimestre	bazo	+ / ncp	+	+	+	21,2	si
10-698	2º trimestre	bazo	+ / ncp	-	-	+	21,9	si
11-652	3º trimestre	bazo	+ / ncp	-	+	+	25,8	si

Cq: valor de ciclo umbral; ncp: no citopático; cp: citopático; nd: no determinado

Tabla 10 (continuación): Muestras de fetos abortados y neonatos bovinos positivos al virus de la diarrea viral bovina (n = 40)

Caso	Edad gestacional	Muestra	AV / biotipo	ELISAag	RT-nPCR	RT-qPCR		Alteraciones patológicas
						resultado	Cq	
12-141	3º trimestre	bazo	-	-	+	+	36	si
13-434	3º trimestre	cerebro	-	-	+	-	nd	si
13-464	neonato	bazo	+ / cp	-	+	+	24,3	si
14-164	3º trimestre	bazo	-	-	-	+	35,4	si
14-287	3º trimestre	bazo	-	-	+	+	21,2	si
14-512	2º trimestre	bazo	-	-	-	+	35,1	si
15-512	3º trimestre	bazo	+ / ncp	+	+	+	19,1	no
15-580	neonato	bazo	-	-	+	+	33	si
16-302	2º trimestre	bazo	-	-	+	-	nd	si
16-478	3º trimestre	bazo	+ / ncp	-	+	+	26,9	si
17-262	neonato	bazo	-	-	-	+	33,3	si
17-361	3º trimestre	bazo	+ / ncp	-	+	+	32,5	si
18-417	neonato	suero	-	-	+	+	30	si
18-437	3º trimestre	fluido fetal	+ / ncp	-	+	+	30,2	si
18-521	3º trimestre	cerebro	+ / ncp	-	+	+	33	no

Cq: valor de ciclo umbral; ncp: no citopático; cp: citopático; nd: no determinado

La proporción de casos positivos al VDVB por ELISAag fue menor a la detectada por AV, RT-nPCR y RT-qPCR ($p < 0,01$), mientras que no hubo diferencias entre estas últimas ($p > 0,42$) (Tabla 11).

Tabla 11: Proporción de fetos abortados y neonatos bovinos positivos al virus de la diarrea viral bovina según la técnica empleada (n = 95)

Técnica	Casos positivos al VDVB		
	N	Proporción (%) [*]	IC _{95%}
AV	28	29,5 ^a	21,9 - 40,2
ELISAag	8	8,4 ^b	3,9 - 15,1
RT-nPCR	26	27,4 ^a	19,1 - 36,9
RT-qPCR	33	34,7 ^a	25,7 - 44,6

^{*}Proporciones con superíndices diferentes difieren significativamente ($p < 0,05$ - Ajuste de Bonferroni).

La Se y Es fueron estimadas considerando al AV como prueba de referencia (Tabla 12). De acuerdo con lo expresado en la Sección 2 de comparación de las técnicas en muestras de sueros, es importante remarcar que el AV se realizó al momento de la obtención de muestra, entre 1997 y 2018, pero no se repitió posteriormente en paralelo con el resto de las técnicas ensayadas. En correspondencia con lo observado en la proporción de casos positivos, la Se fue superior para ambas técnicas moleculares respecto al ELISAag, mientras que la Es fue superior para esta última.

Tabla 12: Sensibilidad y especificidad de las técnicas ELISAag, RT-nPCR y RT-qPCR para la detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de fetos abortados y neonatos bovinos considerando al AV como prueba de referencia (n = 95)

Técnica	Sensibilidad		Especificidad	
	%	IC _{95%}	%	IC _{95%}
ELISAag	27,6	13,7 - 45,3	100	97,1 - 100
RT-nPCR	69	51 - 83,7	90,9	82,4 - 96,3
RT-qPCR	82,8	66,5 - 93,4	86,4	79,8 - 93,2

El porcentaje de acuerdo y la concordancia entre las técnicas se muestra en la Tabla 13. El %_{neg} fue alto (promedio de 87%) en todas las comparaciones. Por el contrario, el %_{pos} fue bajo (promedio de 40%) para las comparaciones que incluyeron al ELISAag y moderado (promedio de 75%) para las comparaciones entre AV y las dos técnicas de RT-PCR. De acuerdo con el coeficiente AC1, la concordancia fue débil entre ELISAag y RT-qPCR y moderada para el resto de las comparaciones realizadas (promedio de 0,7).

Tabla 13: Porcentaje de acuerdo y concordancia entre AV, ELISAag, RT-nPCR y RT-qPCR para la detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de fetos abortados y neonatos bovinos (n = 95)

Técnicas	Porcentaje de acuerdo ^a			Coeficiente de Gwet ^b	
	Negativo	Positivo	AC1	IC _{95%}	Concordancia ^c
AV vs. ELISAag	86,3	43,2	0,68	0,53 - 0,82	Débil a fuerte
AV vs. RT-nPCR	88,9	72,7	0,73	0,59 - 0,87	Débil a fuerte
AV vs. RT-qPCR	89,1	77,4	0,74	0,6 - 0,87	Moderada a fuerte
ELISAag vs. RT-nPCR	87,2	41,2	0,7	0,56 - 0,84	Débil a fuerte
ELISAag vs. RT-qPCR	81,9	34,1	0,57	0,4 - 0,74	Débil a moderada
RT-nPCR vs. RT-qPCR	88,5	74,6	0,72	0,58 - 0,86	Débil a fuerte

^aCichetti y Feinstein (1990); ^bGwet (2008); ^cInterpretación según McHugh (2012)

Hallazgos patológicos

La selección de los casos de aborto o mortalidad neonatal se realizó en función de diferentes criterios (Materiales y Métodos, Sección 3), entre ellos se incluyó la presencia de lesiones histopatológicas compatibles con un agente infeccioso o malformaciones congénitas asociadas al VDVB. De los 40 casos positivos a alguna de las técnicas (Tabla 10), en 32 de ellos se realizó la necropsia.

Si bien las alteraciones patológicas no están incluidas en las hipótesis de trabajo, su presencia resulta de interés en la interpretación de los resultados de los métodos aquí evaluados. Los hallazgos macroscópicos más relevantes consistieron en opacidad corneal (9%, 3/32), hidrotórax (19%, 6/32), hidropericardio (6%, 2/32), ascitis (22%, 7/32), edema subcutáneo (22%, 7/32) y congestión en meninges, pulmones y riñones (19%, 6/32). En 3/19 casos (16%) se observaron defectos congénitos como hidrocefalia (casos 13-464 y 15-580), microcefalia e hipoplasia cerebral (caso 15-580); cráneo abovedado, braquignatismo y desviación nasal (caso 14-287); alopecia e hipotricosis (caso 15-580).

Histológicamente no se observaron diferencias significativas en la frecuencia ($p = 0,61$) ni en la severidad ($p = 0,81$) de las lesiones. La frecuencia de casos con lesiones fue de alrededor del 50% y la proporción de tejidos que presentó lesiones fue menor al 25% (severidad de 0,7 en la escala de 0 a 3), siendo más frecuente la respuesta inflamatoria no supurativa con predominio de linfocitos y macrófagos (Tabla 14).

Tabla 14: Frecuencia, severidad y principales lesiones microscópicas en órganos de casos de fetos abortados y neonatos bovinos positivos a la detección del virus de la diarrea viral bovina (n = 32)

Órgano	% de casos con lesión ^{*,a}	IC _{95%}	Grado de severidad ^{*,b}	IC _{95%}
Corazón	55,6	37 - 73,2	0,77	0,44 - 1,11
Pulmones	51,9	33,5 - 69,9	0,63	0,35 - 0,9
Cerebro	44,4	26,9 - 63,1	0,7	0,35 - 1,08

Lesión	Número de casos con lesiones
Corazón	
Miocarditis no supurativa	5
Pericarditis no supurativa	6
Pericarditis y miocarditis no supurativa	6
Necrosis miocárdica	3
Hemorragia epicárdica y miocárdica	1
Pulmones	
Neumonía intersticial no supurativa	13
Bronconeumonía supurativa	1
Hemorragia interlobular	1
Cerebro	
Encefalitis no supurativa	3
Meningitis no supurativa	7
Meningoencefalitis no supurativa	2
Degeneración y necrosis neuronal	1
Hemorragia en mesencéfalo	1
Displasia cerebelar	2
Disgenesia cortical	1

[†] p > 0,05; ^aprueba de Cochran Q; ^bprueba de Kruskal-Wallis

Evaluación de la seroneutralización viral frente a los subtipos -1a, -1b y -2b del VDVB en fluidos fetales

Se dispuso de 60 fluidos de cavidad, 51 pudieron ser evaluados y 9 fueron tóxicos para el cultivo celular. El 94% (48/51) presentó AcN frente a alguna de las cepas del VDVB utilizadas, mientras que el 6% (3/51) resultaron negativos.

La media geométrica de títulos de AcN fue mayor frente al VDVB-1b (3,66; IC_{95%} = 3,16 - 4,17) y -2b (3,71; IC_{95%} = 3,3 - 4,12) que para el subtipo -1a (2,96; IC_{95%} = 2,42 - 3,51)

($p < 0,05$). La proporción de casos con títulos de AcN frente a los subtipos evaluados se muestra en la Figura 7.

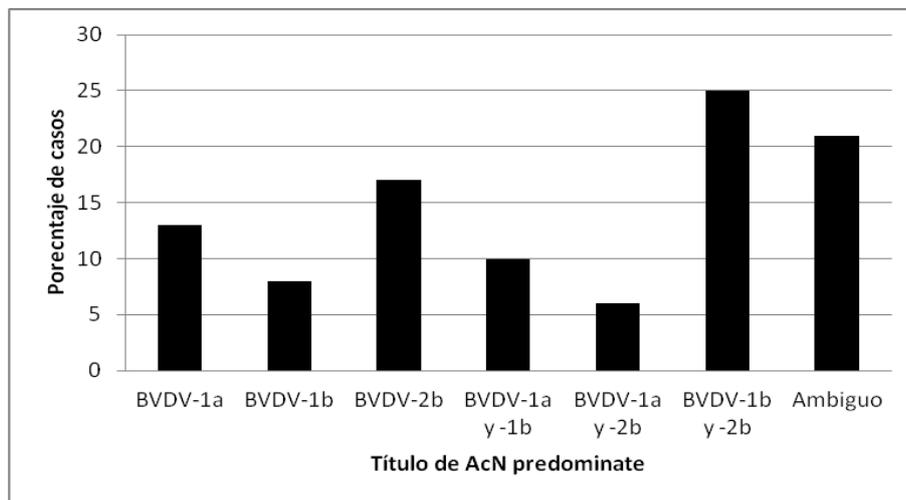


Figura 7: Porcentaje de casos según la respuesta de anticuerpos neutralizantes (AcN) frente a los subtipos -1a, -1b y -2b del virus de la diarrea viral bovina en fluidos de cavidad de fetos abortados y neonatos bovinos ($n = 48$).

De 48 fluidos con AcN, 13 correspondieron a casos positivos y 35 a casos negativos a la detección del VDVB. Asimismo, se detectó la presencia del VDVB en 1 de los 3 fluidos negativos a AcN (Tabla A7, Anexo).

Los 13 casos positivos a AcN y a la detección del VDVB fueron clasificados de la siguiente manera: presencia de lesiones microscópicas ($n = 9$); presencia de malformaciones congénitas y lesiones microscópicas ($n = 1$); sin lesiones microscópicas ($n = 1$); sin dato ($n = 2$). Por otro lado, los 35 casos positivos a AcN y negativos a la detección del VDVB fueron clasificados de la siguiente manera: lesiones microscópicas ($n = 25$); malformaciones congénitas y lesiones microscópicas ($n = 7$); sin lesiones microscópicas ($n = 3$).

SECCIÓN 4:

Caracterización genotípica de las cepas del VDVB identificadas durante el estudio

Mediante la RT-nPCR se tipificó al VDVB-1 y VDVB-2 en 73 muestras, 47 de suero y 26 de fetos abortados y neonatos. El VDVB-1 fue identificado en 70 muestras y el VDVB-2 en 3 muestras.

El análisis filogenético de 41 secuencias del fragmento 5'UTR (Figura 8A) y 2 del fragmento NS5B (Figura 8B), totalizando 43 cepas virales, resultó en la identificación de los subtipos -1a (n = 10; 23%), -1b (n = 30; 70%) y -2b (n = 3; 7%).

El análisis con el programa SDT mostró un rango de identidad nucleotídica de las secuencias 5´UTR del VDVB-1 de 88 a 98%, siendo de 87 a 100% entre los subtipos -1a y de 95 a 100% entre los subtipos -1b. En tanto que el rango de identidad de las secuencias del VDVB-2b fue de 91 a 96%. Al analizar las secuencias de la región 5´UTR obtenidas en este trabajo junto con las secuencias disponibles de Argentina en Genbank, se observó un rango de 80 a 100% para el subtipo -1a, de 90 a 100% para el -1b y de 89 a 100% para el -2b.

Análisis filodinámico del fragmento 5´UTR

Las estimaciones obtenidas a partir del conjunto de secuencias del VDVB-2 mostraron intervalos HPD95% amplios. Esta incertidumbre en las estimaciones probablemente esté asociada al bajo número de secuencias disponibles; por lo tanto, los resultados del conjunto VDVB-2 no son presentados. Un mayor número de secuencias contribuiría a mejorar las estimaciones y la comprensión del comportamiento evolutivo del tipo 2 en Argentina.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos en los conjuntos de secuencias del VDVB-1a y -1b.

Tanto los gráficos de transiciones y sustituciones vs. distancia (Figura A2: , Anexo) como la prueba de Xia (Tabla A8, Anexo) indicaron que los conjuntos de secuencias no presentaron saturación de sustituciones. Asimismo, no se detectaron eventos de recombinación.

El mapeo de verosimilitud mostró diferencias entre ambos subtipos. El conjunto de secuencias del VDVB-1a presentó el 22,3% de los puntos en el centro del triángulo, indicando una señal filogenética *tree-like* (Figura 9, izquierda). Por el contrario, las secuencias del VDVB-1b presentaron el 65,9% de los puntos en el centro, mostrando una señal filogenética del tipo *star-like* (Figura 9, derecha).

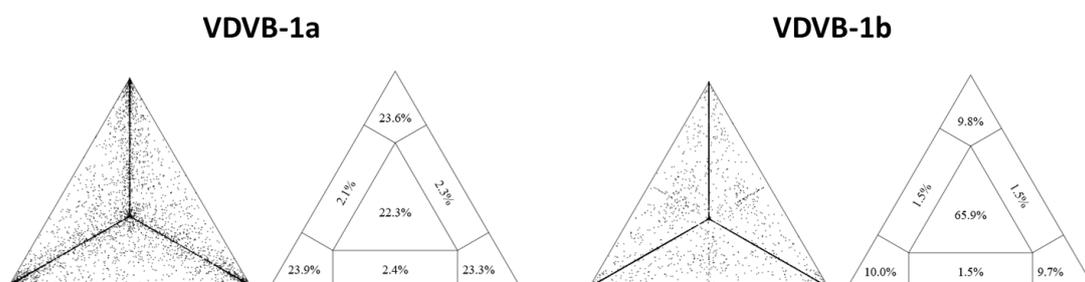


Figura 9: Comparación de mapeo de verosimilitud de los conjuntos de secuencias del fragmento 5´UTR del virus de la diarrea viral -1a y -1b.

El análisis de regresión utilizando el programa TempEst mostró una relación positiva entre distancia genética y tiempo de muestreo en los dos conjuntos de secuencias (Figura A3, Anexo), indicando la presencia de estructura temporal o reloj molecular.

La selección de modelo a través del factor Bayes favoreció el reloj molecular relajado para ambos conjuntos de datos (Tabla A8, Anexo) y el modelo demográfico no paramétrico *Bayesian Skyline* para el subtipo -1b. Mientras que para el subtipo -1a no se encontraron diferencias significativas entre el modelo paramétrico de crecimiento exponencial y los modelos no paramétricos *GMRP Bayesian Skyride* y *Bayesian Skyline* (Tabla A9, Anexo); este último se seleccionó para presentar las estimaciones. Bajo los modelos seleccionados, ambos subtipos mostraron similares tMRCA, siendo la tasa de sustitución del VDVB-1a superior a la del VDVB-1b (Tabla 15).

Tabla 15: Estimaciones de la edad del ancestro común más reciente y tasa de sustitución del fragmento 5'UTR del virus de la diarrea viral -1a y -1b

Subtipo	Año	tMRCA ^a		Tasa (sustituciones/sitio/año)	
		HPD95% ^b	Mediana	HPD95% ^b	
VDVB-1a	1953	1899 - 1980	1,88 x 10 ⁻³	7,3 x 10 ⁻⁴ - 4,75 x 10 ⁻³	
VDVB-1b	1961	1900 - 1982	4,26 x 10 ⁻⁴	1,37 x 10 ⁻⁴ - 6,95 x 10 ⁻⁴	

^aTiempo del ancestro común más reciente; ^bDistribución de probabilidad posterior 95%

La reconstrucción demográfica (Figura 11) muestra que la diversidad genética del subtipo -1a se mantuvo relativamente constante hasta 1998, momento en que hay un incremento exponencial hasta el año 2005 donde se alcanza una meseta. La dinámica poblacional del subtipo -1b mostró un incremento leve y sostenido antes de estabilizarse aproximadamente en 1985. A pesar de las particularidades descritas, ambos subtipos mostraron períodos largos de diversificación genética relativamente constante.

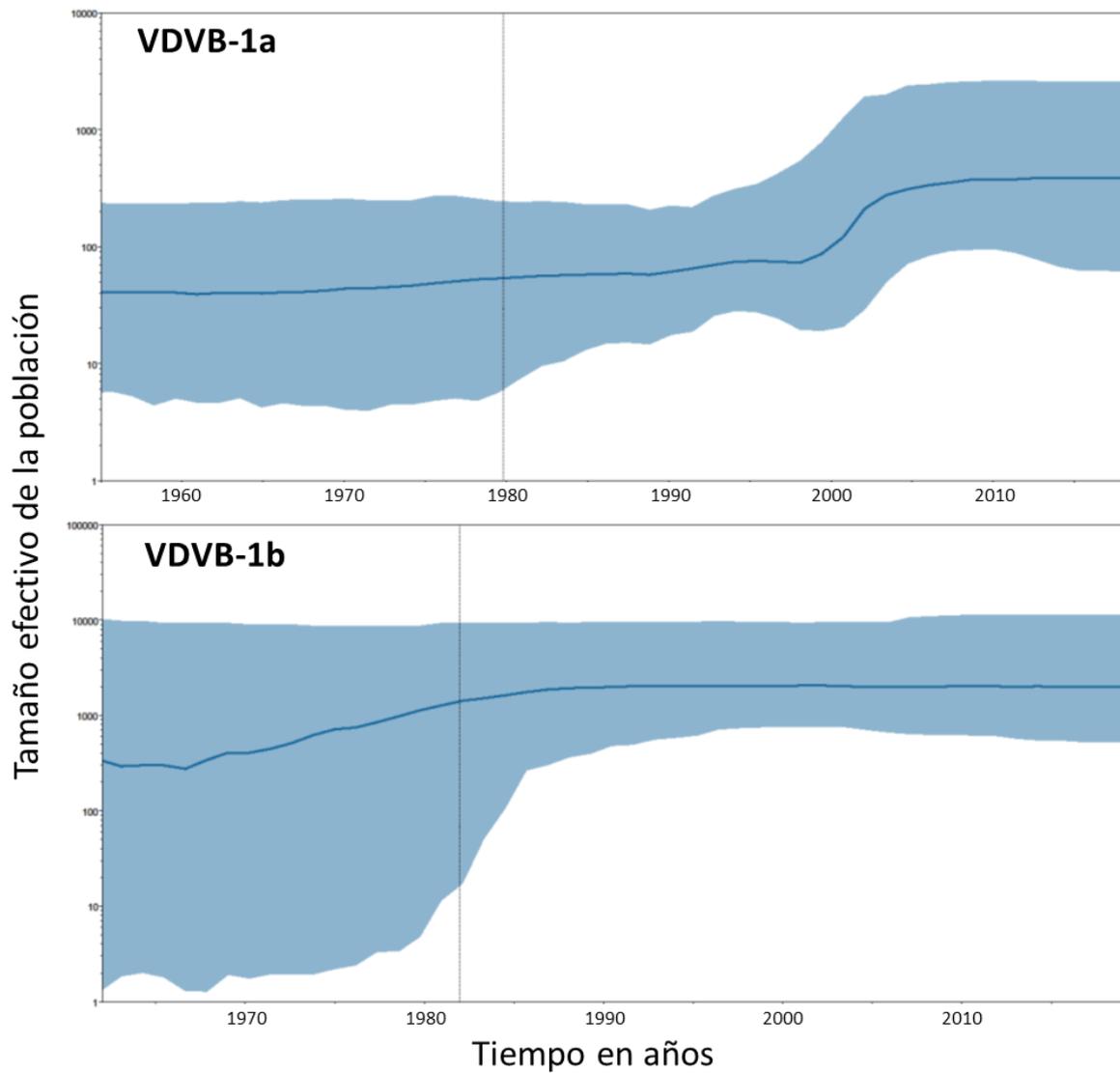


Figura 11: Dinámica poblacional (*Bayesian Skyline*) de los conjuntos de secuencias del fragmento 5'UTR del virus de la diarrea viral -1a y -1b. La línea oscura es la mediana estimada y el área sombreada es el intervalo de confianza 95% (HPD95%).

DISCUSIÓN

El VDVB representa uno de los patógenos virales más importantes que afectan a la producción bovina a nivel mundial (OIE, 2018), siendo causa frecuente de pérdidas reproductivas (Lanyon y col., 2014). En Argentina es un virus endémico con elevada seroprevalencia en los rodeos bovinos (Odeón y col., 2001; Pacheco y Lager, 2003). El impacto económico significativo de esta enfermedad ha llevado a diversos países a iniciar programas de control y erradicación nacionales, regionales y prediales. A diferencia de otras enfermedades infecciosas, el control de la DVB es altamente factible debido a que la patogenia es bien conocida y existen herramientas efectivas para interrumpir el ciclo de transmisión de la enfermedad (Evans y col., 2019). Estas herramientas, entre otras, incluyen el testeo de poblaciones e individuos con el fin de identificar y eliminar los animales PI. Además, la detección del virus o de anticuerpos específicos en fetos abortados o en natimortos es una clara evidencia de circulación del VDVB en el rodeo (Walz y col., 2010).

Existen diversas técnicas de diagnóstico disponibles para la detección del VDVB, dependiendo su elección de la forma de presentación, disponibilidad local de reactivos o *kits* y de los costos. La mayoría de las técnicas han sido desarrolladas y evaluadas para la detección de animales PI (Walz y col., 2010), mientras que su evaluación en especímenes provenientes de pérdidas reproductivas, como abortos o muertes neonatales, ha sido poco explorado. Asimismo, la información sobre el desempeño y factibilidad de uso de diversas técnicas de diagnóstico del VDVB es escasa en Argentina.

En el presente trabajo se realizó la comparación de diferentes técnicas para la detección del VDVB en especímenes habitualmente muestreados como suero y en casos de abortos y mortalidad neonatal. De modo complementario, se caracterizó genéticamente un importante número de cepas virales obtenidas durante el desarrollo del trabajo. El conocimiento de los subtipos circulantes en una región constituye información epidemiológica valiosa para la continua actualización de los métodos de diagnóstico disponibles, el desarrollo de inmunógenos basados en cepas locales y la evaluación de la eficacia de las medidas de control aplicadas.

SECCIÓN 1:

Adaptación de la técnica RT-PCR anidada y múltiple a las condiciones y sistema del laboratorio de trabajo para la detección del VDVB en sueros y muestras fetales

El uso de técnicas moleculares para la detección del VDVB ha ganado popularidad como método de diagnóstico en los últimos años (Lanyon y col., 2014). En diferentes países se ha progresado en el desarrollo de métodos basados en RT-PCR para la identificación del VDVB en diversos tipos de muestras y presentaciones clínicas. Estudios intra e interlaboratorios han demostrado la validez y buena correlación entre los métodos disponibles para la detección del VDVB en programas de saneamiento a partir de diversas muestras como suero, leucocitos, tejido auricular y leche (Kim y Dubovi, 2003; Cornish y col., 2005; Driskel y Ridpath, 2006; Kennedy y col., 2006; Edmonson y col., 2007; Hilbe y col., 2007; Yan y col., 2011). Sin embargo, en Argentina no existen estudios que evalúen la implementación de estos métodos con potencial uso en programas de control de la enfermedad o en el diagnóstico del aborto bovino. En el presente trabajo se modificó y adaptó la técnica de RT-nPCR descrita por Gilbert y col. (1999) para la detección y tipificación del VDVB en suero y tejidos fetales. Conjuntamente, se comprobó su utilidad en otras muestras como leucocitos y tejidos provenientes de animales de diferentes edades (datos no mostrados).

Se han propuesto diferentes estrategias para reducir los elevados costos y tiempo que supone el análisis de grandes cantidades de muestras en programas de control/erradicación del VDVB. Entre estas se encuentra la implementación de RT-PCR directamente de las muestras, sin previa extracción de ARN, como sangre entera (Gilbert y col., 1999; Deregt y col., 2002) o suero (Bachofen y col. 2013). La RT-PCR sin extracción de ARN se ha implementado para la detección de otros virus como influenza (Song y col., 2009), Chikungunya (Pastorino y col., 2005) y Newcastle (Wambura, 2006). En muestras de suero, Bachofen y col. (2013) detectaron el VDVB hasta la dilución 1:100 de un bovino PI mediante RT-PCR sin extracción de ARN y lograron la secuenciación nucleotídica del 94,6% de las muestras obtenidas en un programa de control de la enfermedad. En base a estos resultados, en el presente trabajo se evaluó el desempeño de la RT-nPCR adaptada en nuestro laboratorio para la detección del VDVB en suero, mediante extracción de ARN con TRIzol® y con tratamiento térmico sin previa extracción de ARN según lo descrito (Bachofen y col., 2013). La RT-nPCR modificada en este trabajo resultó positiva hasta la dilución 1:1000 del suero PI (3,7 DICC₅₀/ml) utilizando TRIzol®; mientras que solo se detectó el genoma viral en el suero PI sin diluir (3700 DICC₅₀/ml) cuando la muestra fue sometida a

tratamiento térmico sin extracción de ARN. Las causas que explican esta marcada diferencia respecto a lo reportado por Bachofen y col. (2013) no se pudieron determinar. En parte, el mayor límite de detección informado por estos autores podría asociarse al tipo de enzimas empleadas; los investigadores mencionados usaron un sistema de RT-PCR *SuperScript*[®] III *One-Step* con ADN polimerasa *Platinum*[®] *Taq* (Invitrogen). Este *kit* contiene una polimerasa termoestable o *hot start*, que sería menos susceptible a la presencia de componentes inhibitorios en la muestra que hayan resistido el tratamiento con calor (Abu Al-Soud y Peter Rådström, 1998).

Sensibilidad analítica, especificidad analítica y efecto de la conformación de pools de sueros

El límite de detección de 3,7 DICC₅₀/ml ($10^{0,57}$ DICC₅₀/ml) obtenido en la presente tesis fue similar a los valores de 3 a 50 DICC₅₀/ml informado por los autores que diseñaron los oligonucleótidos (Gilbert y col., 1999). Con estos resultados se demuestra que la sensibilidad analítica obtenida con la RT-nPCR es satisfactoria para detectar animales PI, los cuales presentan títulos virales de $10^{1,6}$ a 10^7 DICC₅₀/ml en suero de animales PI (Brock y col., 1998; Fulton y col., 2009a). Este límite de detección también permite la identificación de animales TI, los cuales presentan títulos virales que varían entre $10^{0,3}$ y $10^{6,7}$ DICC₅₀/ml (Walz y col., 2001; Kelling y col., 2002).

La alta sensibilidad de las técnicas moleculares posibilita su uso en la detección del VDVB en *pools* de muestras como tejido auricular, sangre, suero o leche (Walz y col., 2010; Duvobi, 2013). El objetivo de esta estrategia es minimizar los costos incurridos durante un programa de control/erradicación de una enfermedad de baja prevalencia como la DVB, considerando que se identificará a uno o más animales infectados dentro de un *pool* de muestras (Muñoz-Zanzi y col., 2000, 2006). Los intentos fallidos de replicar esta metodología de trabajo en distintos laboratorios indican que la sensibilidad de las técnicas moleculares está influenciada por la manipulación de muestras o la variabilidad inherente al operario (Walz y col., 2010), por lo que es necesario adaptar esta práctica a la realidad de cada laboratorio.

Al analizar muestras en *pools*, se puede obtener resultados falsos negativos debido a la dilución del virus por debajo de niveles detectables por la técnica (Muñoz-Zanzi y col., 2006). En el presente trabajo, con la técnica RT-nPCR se detectó al VDVB en *pools* de hasta 100 sueros, por encima de las 30 muestras por *pool* recomendadas en base a modelos de simulación (Muñoz-Zanzi y col., 2000; 2006). La conformación en forma artificial de cada *pool* con el suero PI y sueros bovinos negativos con diferentes grados de hemólisis, que puede afectar la tasa de degradación y estabilidad del ARN del VDVB (Weinstock y col., 2001), permitió validar esta técnica para su uso en situaciones reales de saneamiento.

Debe tenerse presente que mediante el análisis de *pools* de muestras pueden obtenerse resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada que podría ocurrir entre muestras durante la confección y procesamiento de los *pools*. Esta probabilidad sería proporcional al incremento del tamaño del *pool* debido a la manipulación de un mayor número de muestras (Muñoz-Zanzi y col., 2006). En el presente trabajo, al desagregar todos los *pools* positivos a la RT-nPCR, se obtuvo al menos una muestra individual positiva en cada uno de ellos, indicando que no hubo resultados falsos positivos. Aunque hay poca información respecto a la probabilidad de contaminación cruzada con el uso de RT-PCR en el diagnóstico del VDVB en *pools*, se asume que en laboratorios con procedimientos adecuados, la probabilidad de que esto ocurra es de 0,01 (Muñoz-Zanzi y col., 2006). Por ejemplo, en un programa de control de DVB, con el uso de RT-PCR se encontraron 2 muestras con resultados falsos positivos de 6110 analizadas, las que fueron asociadas a una posible contaminación cruzada (Rossmanith y col., 2001); mientras que, en otro programa de control, 2 *pools* de 30 muestras cada uno, fueron considerados falsos positivos por contaminación cruzada ya que todas las muestras fueron negativas al analizarlas individualmente (Hanon y col., 2014).

La decisión del tamaño óptimo del *pool* no solo depende de la sensibilidad de la técnica, también deben considerarse otros factores como la prevalencia esperada de la enfermedad, edad de los animales, tamaño del rodeo y costos (Weinstock y col., 2001; Muñoz-Zanzi y col., 2006; Smith y col., 2008). Si el tamaño del *pool* es demasiado grande, aumenta las chances de identificar *pools* positivos con sólo uno o dos animales positivos diluidos en un gran número muestras negativas, lo que resultará en el análisis de muchas muestras individuales aumentando el costo final (Muñoz-Zanzi y col., 2000). Por el contrario, si se conforman *pools* demasiado pequeños, el beneficio económico de esta metodología se perderá (Muñoz-Zanzi y col., 2000; 2006). Mediante un modelo de simulaciones y considerando una prevalencia de bovinos PI de 0,5% a 3%, Muñoz-Zanzi y col. (2000) encontraron una relación entre costo, prevalencia y tamaño óptimo del *pool*. En tal sentido, el tamaño de *pool* que implicó el menor costo para prevalencias de 0,5%, 1%, 2%, 2,5% y 3% fue de 15, 11, 8, 8, 7 y 6 muestras, respectivamente. Esto indica que, a mayor prevalencia, menor es el tamaño óptimo de *pool*. En base a estos resultados, no se recomienda el empleo de *pools* en muestras provenientes de animales con signos clínicos o en los que se sospecha una alta prevalencia del virus, debido al gasto adicional de realizar pruebas individuales en muestras a partir de una gran cantidad de grupos positivos (Muñoz-Zanzi y col., 2000).

La amplificación por RT-nPCR en diversas muestras y en sobrenadante de cultivo celular con presencia de otros agentes responsables de pérdidas reproductivas en Argentina (herpesvirus bovino, *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus*, *Leptospira* spp. y *Neospora*

caninum), pero libre de VDVB, arrojó resultados negativos, confirmando la especificidad satisfactoria de los oligonucleótidos utilizados (Gilbert y col., 1999). El método permitió detectar cepas de referencia y los subtipos de mayor circulación en el país, aunque no puede descartarse alguna falla en la identificación de otros subtipos detectados esporádicamente en Argentina, como el VDVB-1i (Laboratorio Virología Animal EEA INTA Balcarce, datos sin publicar), VDVB-1j (Jones y col., 2001, 2004) o la especie VDVB-3 o Hobi-like, recientemente identificada en el país (Pecora y col., 2019).

Detección del virus de la diarrea viral bovina en programas de saneamiento y casos de diagnóstico

La técnica de RT-nPCR optimizada se utilizó para la detección del VDVB en *pools* y en muestras individuales de suero bajo condiciones de laboratorio de diagnóstico. Se analizaron un total de 2864 sueros provenientes de 55 establecimientos ganaderos, principalmente de cría, de la provincia de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba, que representan una alta proporción (35,5%, 11,3% y 8,9%, respectivamente) de las existencias ganaderas en el país (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2019).

Como fue señalado previamente, por diferentes motivos no se obtuvo un segundo muestreo de los bovinos positivos a la detección del VDVB, por lo tanto, no fue posible determinar si esos casos correspondían a infecciones transitorias o persistentes. Cabe señalar que para confirmar la condición de PI es necesario re-testear a las 3 o 4 semanas posteriores aquellos individuos que inicialmente resultaron positivos (Larson, 2005). La diferenciación de infecciones agudas y persistentes también tiene como objetivo evitar el descarte innecesario de animales que estén cursando infecciones transitorias. No obstante, muchos productores ganaderos son renuentes a correr el riesgo de dejar un potencial PI en el rodeo y deciden eliminar los positivos, en lugar de realizar un segundo muestreo para confirmar o descartar su condición de PI. Esta situación ha sido descripta previamente, aún si se ofrece la determinación en forma gratuita (Hanon y col., 2014; Odeón A., comunicación personal).

Los animales PI excretan el virus de por vida, mientras que los que cursan una infección transitoria sólo presentan viremia por aproximadamente 14 días (Brownlie y col., 1987). Por lo tanto, cualquier muestra que resulte positiva a la detección del VDVB es más probable que corresponda a un bovino PI que a un TI (Muñoz-Zanzi y col., 2000; Smith y col., 2008). En este sentido, diversos estudios confirmaron que del 63% al 92% de los animales positivos en el primer muestreo eran PI (Wittum y col., 2001; Hanon y col., 2014; Kane y col., 2015). Asimismo, Larson y col. (2005b) encontraron que el 90% de los *pools* positivos contenían al menos un PI. Por esta razón, es factible que la mayoría de los bovinos detectados como positivos en el presente trabajo hayan sido animales PI. Con excepción del

pico de un brote de la enfermedad, la detección de animales TI en un *pool* de muestras es muy baja (Muñoz-Zanzi y col., 2006). Sin embargo, debe considerarse que, por su alta sensibilidad analítica, las técnicas moleculares pueden detectar bajas cargas virales en animales con infección aguda (Sandvik y col., 2001; Hanon y col., 2014); por lo tanto, en un segundo muestreo la proporción de animales PI podría resultar menor a la esperada. En referencia a esto, en otros estudios se ha observado que solo el 23% y el 32% de los bovinos positivos al VDVB por RT-PCR en el primer testeo fueron confirmados como PI en el segundo muestreo (Scheffers y col., 2008; Hanon y col., 2014).

Trabajos previos describieron brotes de DVB y sus consecuencias productivas, reproductivas y económicas en rodeos bovinos del país (Odeón y col., 2003, 2016; González Altamiranda y col., 2012), pero no hay estudios que evalúen la frecuencia de infección del VDVB en un número significativo de rodeos bovinos. Si bien este estudio no fue realizado bajo un diseño epidemiológico riguroso, el mismo provee una estimación de la prevalencia del VDVB. Del total de bovinos muestreados, 29 resultaron positivos a la técnica, arrojando una prevalencia de animales infectados del 1%. Como era de esperar, la detección de VDVB fue mayor en animales jóvenes respecto a adultos. La identificación de bovinos infectados, en particular de aquellos que cursan una infección persistente, es menos frecuente en bovinos adultos debido a que generalmente los animales PI tienen una vida corta, muriendo antes de los 18 meses de vida o siendo removidos por su bajo rendimiento productivo/reproductivo (Presi y col., 2011; Sarrazin y col., 2013). No obstante, en este estudio se identificaron 3 vacas positivas al VDVB (10%; 3/29). Esta situación fue previamente reportada (Presi y col., 2011) y remarca la importancia de no sólo muestrear animales jóvenes, debiéndose también incluir los bovinos adultos (vacas y toros) en los programas de saneamiento. Al respecto, diversos autores han encontrado niveles de infección de 0,07 a 0,1% en bovinos adultos (Smith y col., 2008), de 0,33 a 0,55% en jóvenes (Larson y col., 2005b; Fulton y col., 2009b) y de 0,3 a 0,5% en estudios que incluyeron bovinos de diferentes edades (Yan y col., 2011).

La prevalencia del 1% de bovinos infectados en este trabajo es similar a los valores hallados en un metaanálisis mundial publicado recientemente (Scharnböck y col., 2018), donde se demuestra que la prevalencia de bovinos PI es de 0,59 a 0,97%, en tanto que la de bovinos con viremia (incluye individuos con infección transitoria) es de 3,1 a 5,8%. No obstante, es posible que en el presente trabajo no se hayan detectado todos los animales con infección viral dado que no se muestreó el total de la existencia ganadera de cada establecimiento. Además, algunos animales con signos clínicos compatibles con DVB, enfermedad de las mucosas u otras enfermedades asociadas pudieron haber muerto antes del muestreo. La muerte temprana de animales previo al muestreo influye sobre los niveles de prevalencia de PI publicados (Lindberg, 2003; Presi y col., 2011). En consecuencia, la

frecuencia de infección por el VDVB obtenida en esta tesis podría estar subestimada. En este sentido, en diferentes estudios se observó que en la mayoría de los establecimientos en los que se identificó un individuo infectado, también se identificaron múltiples bovinos PI (Kelling y col., 1990; Holland y col., 1993; Taylor y col., 1997; Wittum y col., 2001; Kane y col., 2015; Odeón y col., 2016; Bianchi y col., 2017). Por lo tanto, es probable que en los establecimientos evaluados en este trabajo, en los que se detectó algún bovino positivo, hayan quedado animales infectados y no muestreados en los diferentes rodeos. Para mejorar la calidad de la información sobre la práctica del saneamiento del VDVB del presente estudio, hubiese sido deseable realizar un seguimiento más riguroso de la población, aunque esto no fue posible.

A nivel de establecimiento, la prevalencia de positivos al VDVB detectados en este trabajo, incluyendo propuestas de control y análisis de uno o pocos individuos, fue del 20% (11/55). Al respecto, Scharnböck y col. (2018) informaron un valor de 27% a nivel mundial de rodeos con presencia de PI y de 17,8% en rodeos con animales con viremia.

Para el desarrollo de la presente tesis se obtuvieron muestras de establecimientos bovinos de producción de carne y leche. De los 55 establecimientos, solo se muestrearon cuatro tambos, siendo uno de ellos positivo a la presencia del VDVB. Este bajo nivel de muestreo en explotaciones lecheras se explica por la zona de influencia de la EEA INTA Balcarce, en la que predominan los establecimientos dedicados a la cría y recría bovina. En general, los tambos son manejados de forma más intensiva que los rodeos para carne por lo que se esperan diferentes niveles de infección entre ambos sistemas de producción (Sarrazin y col., 2013; Smith y col., 2014). Por ejemplo, en el Reino Unido la prevalencia de PI fue tres veces mayor en tambo que en rodeos de carnes, posiblemente explicado por i) el elevado contacto entre animales que incrementan la probabilidad de transmisión viral en los tambos (los rodeos de carne son manejados de forma menos intensiva respecto a los tambos; Gates y col., 2013); ii) la mayoría de los rodeos de carne tienen un período de servicio estacionado (Van Campen, 2010; Smith y col., 2014) y los individuos tienen una vida útil más corta en comparación a los rodeos lecheros y, por lo tanto, probablemente una mayor tasa de autolimitación de la enfermedad; es decir, los animales PI se eliminan del rodeo a través de las muertes naturales, sacrificios o ventas; sin una intervención activa en el control de la enfermedad (Scharnböck y col., 2018). Contrario al cuadro epidemiológico del Reino Unido, en USA se encontró mayor prevalencia de PI en los establecimientos de producción de carne (0,41%) que en los de producción lechera (0,29%) (Scharnböck y col., 2018). Esta mayor prevalencia se asocia a que los terneros permanecen en contacto con sus madres hasta el destete a los 5-7 meses de edad (Smith y col., 2014), aumentando el tiempo de exposición de potenciales PI con hembras en gestación. Por el contrario, en los sistemas lecheros de Estados Unidos, los terneros son retirados inmediatamente de sus

madres (Van Campen, 2010) y del contacto con hembras gestantes, reduciendo de esta manera la generación de nuevos animales PI. La información obtenida en esta tesis no es suficiente para comparar la frecuencia de infección entre rodeos de carne y tambos. Por lo que se plantea la necesidad de realizar estudios epidemiológicos del VDVB en los diferentes sistemas de explotación bovina de Argentina. Esta información permitirá el diseño de estrategias de control de la enfermedad adaptadas a la situación particular de cada sistema.

Aproximadamente en la mitad de los establecimientos en los que se identificó al VDVB, uno o más animales presentaron signología clínica compatible con la infección del virus, situación que puede incrementar los niveles de prevalencia del VDVB (Houe, 1999). Esto concuerda con los resultados informados por Scharnböck y col. (2018), quienes observaron que los establecimientos con presencia de bovinos con signos clínicos presentaron mayor prevalencia de infecciones persistentes (44,5%) y de viremia (49,2%) respecto a los que no presentaban animales con signología (PI: 29,3%; viremia: 8,9%, Scharnböck y col., 2018). El monitoreo de rodeos a través de la observación de signos clínicos compatibles con el VDVB es considerado una herramienta de vigilancia de muy baja sensibilidad (Wittum y col., 2001; Larson, 2005). Por ejemplo, el VDVB fue detectado en el 53% de los rodeos bovinos en los que no hubo sospecha de infección (Houe y Meyling, 1991); mientras que en el 81% de los rodeos en los cuáles el veterinario sospechó la presencia del VDVB, no se identificó a ningún animal PI (Wittum y col., 2001). La dificultad de utilizar la presencia de signos clínicos como un indicador de infección por el VDVB radica en que el 70-90% de las infecciones cursa en forma subclínica y el virus genera un amplio espectro de signología común a otros agentes infecciosos (Baker, 1995; Walz y col., 2010; Presi y col., 2011). Sin embargo, la identificación del VDVB en animales aparentemente sanos, enfermos, muertos o en fetos abortados justifican el muestreo del rodeo para la detección de animales PI (Walz y col., 2010).

De los resultados obtenidos en el presente trabajo y lo informado en el análisis a nivel mundial (Scharnböck y col., 2018) puede asumirse que la mayoría de los rodeos no poseen bovinos infectados con VDVB. No obstante, cuando se detecta un animal infectado, es esperable encontrar más individuos positivos en el rodeo. Se desconocen la prevalencia y los factores de riesgo asociados a la circulación del VDVB en los sistemas productivos de carne, leche o mixtos de Argentina. Esta tesis aporta datos preliminares al respecto, siendo necesarios estudios adicionales para comprender el cuadro epidemiológico de la enfermedad en los diferentes sistemas productivos. Esta información permitirá el diseño y priorización en la ejecución de programas de control.

Muestras fetales

Las infecciones con el VDVB son causa frecuente de pérdidas reproductivas en bovinos (Lanyon y col., 2014). Aunque los datos de serología fetal reportados en Argentina indican una elevada exposición al VDVB (Moore y col., 2003; Sanabria y col., 2007), la frecuencia del virus como causa confirmada de aborto y/o mortalidad neonatal es baja (Campero y col., 2003; Fernández y col., 2007; Morrell y col., 2008, 2019). Generalmente las muestras fetales presentan elevado grado de autólisis (Duffel y col., 1984; Murray, 1991) y exposición a contaminantes ambientales (Holler, 2012; Ridpath y col., 2009, 2014). Esta situación puede afectar la sensibilidad diagnóstica de técnicas virológicas clásicas como el AV (Tramuta y col., 2011; Bauermann y col., 2013), lo que indicaría que el verdadero impacto reproductivo generado por el VDVB posiblemente esté subestimado.

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad del diagnóstico, particularmente la detección del virus, la misma técnica de RT-nPCR descrita para muestras de suero también fue evaluada y adaptada para su empleo en muestras de cerebro, pulmón y bazo de fetos y neonatos. Para esto se fijó una cantidad máxima de ARN total de 1000-1200 ng en 25 µl de reacción de PCR en cualquiera de los tres tejidos evaluados. Con concentraciones superiores se observaron falsos negativos en muestras de bazo y pulmón, no así en cerebro. Las altas concentraciones de ARN (Pikaart y Villeponteau, 1993; Hamel y col., 1995) y la presencia de inhibidores propios de la muestra o externos (Ridpath y col., 2014) pueden inhibir la reacción de RT-PCR. En tal sentido, Ridpath y col. (2014) demostraron que la contaminación de las muestras con materia fecal, simulando un aborto en condiciones de campo, redujo la sensibilidad de la RT-PCR luego de mantener los especímenes a -20°C durante 36 meses; por lo tanto, se recomienda una limpieza o reducción de contaminantes en las muestras de tejidos fetales, en particular si estos van a ser archivados por largos periodos de tiempo.

Si bien el fragmento génico de interés del VDVB se detectó en todos los tejidos mencionados, los resultados en esta tesis sugieren que el cerebro sería la muestra de elección para la identificación del VDVB con técnicas moleculares en casos de abortos y/o mortalidad neonatal; sin embargo, esto no fue confirmado mediante un diseño experimental *ad hoc*. Al respecto, tras someter diversos órganos fetales a diferentes condiciones de temperatura y presencia de contaminantes ambientales, Ridpath y col. (2014) concluyeron que el ARN del VDVB es más estable en cerebro que en el resto de los tejidos, entre ellos piel, músculo, órganos torácicos y abdominales. Aunque el muestreo de cerebro puede ser más laborioso que otros tejidos, el tejido nervioso presenta varias ventajas para la detección del VDVB además de la estabilidad del genoma viral. De acuerdo con lo planteado por Ridpath y col. (2014), la barrera hemato-encefálica limitaría las contaminaciones bacterianas y la ubicación anatómica dentro del cráneo lo hace menos propenso al contacto con

contaminantes ambientales. Por lo tanto, el muestreo del cerebro debería ser considerado en la rutina de diagnóstico de aborto o muerte neonatal por el VDVB. Exceptuando los casos en los que se sospechan o evidencian defectos congénitos en sistema nervioso, rara vez se envían muestras de cerebro para diagnóstico del VDVB (Ridpath y col., 2014).

Aunque la RT-nPCR evaluada en esta tesis mostró un buen desempeño en tejidos de fetos abortados, la longitud del producto amplificado de PCR podría tener efectos negativos sobre la sensibilidad de la técnica en este tipo de muestras. En la Sección 3 de esta Discusión se aborda nuevamente el método.

En esta sección se destaca la adaptación e implementación de la técnica RT-nPCR descrita por Gilbert y col. (1999) para la detección y tipificación del VDVB en muestras de suero individual y en *pools*, así como en tejidos fetales o neonatales. Es de destacar que durante el procesamiento de más de 2800 sueros y más de 100 muestras fetales no se observaron amplificaciones inespecíficas ni contaminaciones cruzadas, situación que puede darse con PCR anidadas, especialmente en un entorno de alto volumen de diagnóstico.

En la formulación de programas de control o erradicación, sumado a la disponibilidad de técnicas diagnósticas confiables, resulta esencial conocer la situación epidemiológica del virus en los rodeos para planificar propuestas racionales y económicamente posibles. La prevalencia del VDVB puede verse influenciada por varios factores como el momento de muestreo (Houe, 1995; Lindberg, 2003), tipo de explotación (Marschik y col., 2018), edad de los animales muestreados (Daves y col., 2016), uso de vacunas (Houe, 1995; Duncan y col., 2016), implementación de programas de control (Moenning y col., 2005), método de diagnóstico aplicado (Larson y col., 2005a; Lanyon y col., 2014), entre otros. Aunque el presente trabajo de tesis no fue concebido como un estudio epidemiológico, los resultados obtenidos aportan información valiosa al escaso conocimiento sobre la prevalencia del VDVB en Argentina, tanto a nivel de individuo como de establecimiento. No obstante, son necesarios estudios epidemiológicos adicionales para ampliar y validar estos resultados.

SECCIÓN 2:

Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada y múltiple, RT-PCR en tiempo real y ELISA luminométrico asistido por filtración para la detección del VDVB en muestras de suero bovino

El control de la DVB depende de la identificación y eliminación de los animales PI debido al importante rol epidemiológico que estos cumplen. Existen diversos métodos de diagnóstico comercialmente disponibles para la detección del VDVB, mayormente desarrollados para la detección de infecciones persistentes (Walz y col., 2010; Lanyon y col., 2014). La elección de alguna de estas técnicas depende de varios factores como presentación clínica, contexto epidemiológico, disponibilidad local y consideraciones económicas (Walz y col., 2010). Además, de acuerdo con las recomendaciones de la OIE, cualquier método diagnóstico debería ser validado bajo las condiciones epidemiológicas de la región o población objetivo. En el caso particular del VDVB, la variabilidad de los tipos y subtipos según la región geográfica debe ser considerada en el diseño e implementación de métodos de diagnóstico (Ridpath, 2010). El desempeño de las técnicas de diagnóstico disponibles ha sido ampliamente documentado en la bibliografía internacional; mientras que en Argentina aún no se dispone información sobre estudios comparativos entre diversas técnicas para la detección del VDVB. En el marco de este contexto, se evaluaron dos métodos de RT-PCR (de punto final y cuantitativo) y un ELISA de captura de antígeno de desarrollo nacional (Capozzo y col., 2010; Wilda y col., 2012) para la detección del VDVB en muestras de suero bajo las condiciones epidemiológicas locales. Los resultados obtenidos proveen información importante respecto a la implementación de insumos de laboratorio a nivel local, los cuáles deben ser adquiridos en el extranjero e importados, representando elevados costos.

Es importante recordar que el AV, utilizado como método de referencia, fue realizado al momento de recepción de las muestras de suero, entre 2009 y 2019, mientras que el resto de las técnicas se realizaron entre 2016 y 2019. La degradación del ARN y/o del antígeno viral durante el tiempo de almacenamiento y la consecuente baja en la sensibilidad del FAL-ELISA o de los métodos de RT-PCR en comparación al AV no debería descartarse; no obstante, las tres técnicas detectaron mayor cantidad de sueros positivos respecto al AV. El hecho de que el ARN y el antígeno viral se hayan conservado en muestras de suero durante al menos nueve años denota la alta estabilidad del VDVB (Saliki y col., 1997). De acuerdo con lo expresado puede concluirse que, bajo condiciones apropiadas de conservación, el tiempo transcurrido entre el muestreo y la realización de la técnica de

diagnóstico tendría mínimos efectos en el desempeño del ELISA o de ambos tipos de RT-PCR, siendo estos métodos de gran utilidad en estudios retrospectivos.

En el presente trabajo no sólo fue evaluada la concordancia entre técnicas, también se calculó el %_{pos} y %_{neg}. Esto permitió cuantificar el grado de acuerdo e identificar cuáles fueron los posibles motivos de incongruencia entre técnicas para minimizarlos o eliminarlos, de ser posible (Sargeant y Martin, 1998). Bajos valores de %_{pos} y %_{neg} indican diferentes niveles de Se y Es, respectivamente (Cicchetti y Feinstein, 1990). Conocer estos indicadores es de suma utilidad para identificar fortalezas y debilidades de los métodos evaluados.

Los niveles moderados de %_{pos} y %_{neg} observados en las comparaciones que involucraron al FAL-ELISA se explicarían por la mayor cantidad de muestras positivas de esta técnica respecto a AV (+18), RT-nPCR (+13) y RT-qPCR (+11). En relación con estos resultados, el FAL-ELISA presentó un bajo nivel de Es (67,2%). La discrepancia entre FAL-ELISA y el resto de las técnicas podría ser consecuencia de falsos positivos asociados a la interferencia en el método ELISA por componentes del suero. En este sentido, el uso del FAL-ELISA para detectar el VDVB en muestras de tejido, previo lisado con *buffers*, mostró un excelente desempeño (Capozzo A., comunicación personal). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de falsos negativos con ambas RT-PCR causados por la menor preservación del ARN respecto al antígeno viral durante el período de almacenamiento. Contrario a lo observado en este estudio, diferentes trabajos reportaron desempeño similar o incluso menor del ELISA respecto a las técnicas moleculares (Hilbe y col., 2007; Hanon y col., 2014). Tanto la proteína NS3 como los fragmentos genómicos NS5B y 5'UTR son altamente conservados entre las diferentes cepas del VDVB (Dubovi 2013; Newcomer y col., 2013; Schweizer y Peterhans, 2014), por lo que no es esperable fallas en la detección de estos debido a la variabilidad génica o antigénica entre subtipos virales. En tal sentido, es preciso remarcar que el FAL-ELISA aún está en etapas de desarrollo y evaluación, por lo que son necesarios futuros experimentos para estandarizar este método. Su disponibilidad sería de gran utilidad e importancia por ser un desarrollo nacional evaluado con cepas locales del VDVB.

La comparación entre ambos métodos RT-PCR presentó los mayores niveles de concordancia, %_{pos} y %_{neg}. En línea con esta observación, tanto la Se y como la Es para ambas técnicas fue similar. Asimismo, no se observaron diferencias según la región del genoma amplificado. En base a estos resultados puede postularse que la técnica RT-qPCR podría adaptarse para su empleo en *pools* de sueros tal como lo detallado con RT-nPCR (Sección 1). En diversos estudios se demostró la utilidad de RT-qPCR en *pools* de sangre (Letellier y Kerkhofs, 2003; Hanon y col., 2014), tejido auricular (Yan y col., 2011) y suero (Smith y col., 2008). A su vez, dado que la tecnología qPCR permite cuantificar copias virales, diferentes autores han propuesto este método para discriminar infecciones agudas

de persistentes en base al valor de Cq con solo una determinación (White y col., 2010; Hanon y col., 2014; Peddireddi y col., 2018), lo que evitaría un segundo muestreo y las complicaciones de manejo asociadas. Usualmente los bovinos PI tienen mayor carga viral que los TI, por lo tanto, es esperable que el valor Cq sea significativamente menor en las muestras procedentes de animales PI. Al respecto, Hanon y col. (2014) propusieron un valor umbral óptimo de 24,79 (sensibilidad = 94,1%; especificidad = 98,2%) en muestras de sangre para discriminar un animal PI de un TI, es decir animales con un Cq por debajo de este valor serán clasificados como PI. Mientras que, si el objetivo es detectar el 100% de los animales PI, el valor de corte debe elevarse a 28,89; lo que resultará en falsos positivos (sensibilidad = 100%; especificidad = 89,5%). Resultados similares fueron informados por White y col. (2010) a partir de muestras de sueros, en las que identificaron el 97% de los bovinos PI con un Cq umbral de 34. Por el contrario, Peddireddi y col. (2018) solo pudieron diferenciar animales PI de TI a partir de muestras de tejido auricular (Cq 37,1 vs. Cq 34,4) pero no de leucocitos, suero e hisopado nasal. La interpretación de un único resultado basado en el valor Cq puede complicarse por la variación en los niveles de viremia intermitente en bovinos PI (Laureyns y col., 2010), situación en la que el título viral en animales con infección persistente puede ser similar o inferior al título viral en animales con infección transitoria (Brock y col., 1998). El valor de Cq umbral no es único para cada situación y deberá calibrarse en cada laboratorio según el tipo de muestra y disponibilidad de reactivos.

Según Dubovi (2013), hay interrogantes respecto a si la selección de una prueba diagnóstica debería centrarse en su desempeño para diferenciar animales PI de TI. Desde la perspectiva de un programa de control/erradicación, un animal PI no detectado tiene mayores consecuencias productivas y económicas que la eliminación de un animal que realmente no cursaba una infección persistente. Por lo tanto, repetir la prueba diagnóstica sobre un animal PI sólo sería de interés académico (Dubovi, 2013). En línea con lo expresado anteriormente, Tarabla y Signorini (2013) plantean que, en el caso de la aplicación de técnicas diagnósticas en programas de control o erradicación, son especialmente necesarias técnicas de alta Se para evitar falsos negativos, teniendo la Es un rol secundario. No obstante, cuando el programa avanza se espera una disminución de la prevalencia y con ello un cambio de estrategia hacia la selección de técnicas con alto nivel de Es. Desde este punto de vista, sería más conveniente obtener falsos positivos que falsos negativos (Dubovi, 2013). Teniendo en cuenta este planteo, cualquiera de los métodos de diagnóstico evaluados sería de utilidad, considerando que el FAL-ELISA (aún etapas de desarrollo) podría arrojar mayor proporción de falsos positivos respecto a los métodos moleculares, pero esto no afectaría el éxito de un programa de control/erradicación.

Dado que cada técnica diagnóstica tiene ventajas, desventajas y diferentes criterios de aplicación según el contexto (Edmondson y col., 2007), resulta importante tener en cuenta algunas consideraciones al momento de la elección. Por ejemplo, la presencia de anticuerpos calostrales en suero puede generar resultados falsos negativos cuando se utiliza AV o ELISA, mientras que esta interferencia no es esperada con métodos moleculares (Fux y Wolf, 2012). En tal sentido, la detección del VDVB por AV o ELISA en muestras de suero no es recomendable en animales menores de 3 meses de edad (Dubovi, 2013). Tal es el caso del análisis de muestras de suero de 12 terneros de 3 meses de edad pertenecientes a un rodeo argentino, que resultaron positivos al VDVB por RT-nPCR, pero fueron negativos al AV y a un ELISAag comercial (Louge Uriarte E. y González Altamiranda E., comunicación personal). Cabe señalar que en el presente trabajo los sueros empleados para evaluar las técnicas diagnósticas pertenecieron a bovinos mayores de 6 meses, por lo que la interferencia por anticuerpos calostrales fue desestimada.

Otro punto para considerar es que en la presente tesis las técnicas fueron comparadas en muestras de sueros individuales, no así en sueros agrupados en *pools*, exceptuando la técnica RT-nPCR utilizada en casos de control y diagnóstico del virus (Sección 1). El método de RT-PCR es considerado más sensible que la técnica ELISA, por lo que se recomienda el uso de los métodos moleculares en *pools* de muestras para la detección del VDVB, no siendo de utilidad el ELISA para estos casos (Cleveland y col., 2006; Hanon y col., 2014; Lanyon y col., 2014). En este sentido, la detección del VDVB en programas de control/erradicación usualmente está basada en el uso de RT-PCR en *pools* con la subsecuente detección del virus en muestras individuales con RT-PCR o ELISA (Walz y col., 2010; Dubovi, 2013).

SECCIÓN 3:

Comparación de aislamiento viral, RT-PCR anidada, RT-PCR en tiempo real y ELISA de captura de antígeno para la detección del VDVB en muestras de fetos abortados y neonatos bovinos

El diagnóstico del aborto o muerte neonatal como consecuencia de una infección por el VDVB es particularmente dificultoso por dos razones principales. En primer lugar, el feto abortado puede no ser detectado o bien, las muestras recolectadas para análisis pueden no ser las apropiadas (Campero y col., 2003; Carpenter y col., 2006). En segundo lugar, la autólisis fetal y las condiciones de preservación de las muestras una vez obtenidas tienen efecto negativo sobre la sensibilidad de la mayoría de las técnicas empleadas (Hyndman y col., 1998; Ridpath y col., 2014). Para mejorar la capacidad diagnóstica, la detección del virus debe estar asociada a la evaluación de otros aspectos como la patología fetal, respuesta serológica, anamnesis y/o la ausencia de otros agentes reproductivos (Baker, 1995; Graham y col., 2009; Anderson, 2012). Debido a ello resulta necesario tener un enfoque multidisciplinario para confirmar al VDVB como causa de pérdidas reproductivas en el ganado bovino. Bajo este contexto, en el presente trabajo se propuso contribuir a la mejora del diagnóstico del VDVB en casos de aborto y mortalidad neonatal abordado mediante la comparación de diferentes técnicas para la detección del virus en tejidos de fetos y neonatos.

En este estudio se compararon diferentes métodos de diagnóstico para identificar al VDVB en muestras almacenadas a lo largo de 22 años. Por lo tanto, como fue previamente expresado para las muestras de suero, la viabilidad del ARN y/o del antígeno viral pudo verse afectada por el tiempo y las condiciones de almacenamiento de las muestras. De igual forma, es necesario apuntar que las estimaciones de Se y Es se realizaron considerando al AV como prueba de referencia, que fue realizada en el momento en que las muestras fueron recibidas en el laboratorio, entre 1997 y 2018, mientras que el ELISA_{Ag} fue realizado en 2018 y ambas técnicas de RT-PCR durante 2016 y 2019. En consecuencia, los niveles de Se y Es podrían estar subestimados como se discutió previamente. A pesar de estas consideraciones respecto al diseño experimental, la información obtenida resulta valiosa ya que se evaluaron las técnicas diagnósticas en muestras almacenadas durante largos periodos de tiempo y con diferentes grados de autólisis, representando lo que ocurre en la práctica diaria de diagnóstico, particularmente con las muestras de casos de abortos o mortalidad neonatal, que generalmente se ven expuestos a condiciones desfavorables que conllevan a la autólisis. Se resalta la importancia de haber analizado 40 casos de abortos o mortalidad neonatal asociados al VDVB ya que, además de la complicación en el

diagnóstico, la supervivencia fetal del 70% luego de la infección viral (Nettleton y Entrican, 1995) dificultan la posibilidad de evaluar un número significativo de casos positivos. En tal sentido, en estudios de comparación de técnicas de diagnóstico similares a esta tesis se utilizaron 25 (Graham y col., 2009) y 36 (Ellis y col., 1995) casos positivos.

La edad de los casos positivos a la detección del VDVB estuvo comprendida entre el primer trimestre de gestación y los 11 días de vida, correspondiendo el 78% a fetos desde el tercer trimestre de gestación. Esto puede asociarse a la menor dificultad de hallar en el campo fetos de avanzada edad gestacional respecto a aquellos más pequeños, siempre y cuando se implementen sistemas de recorridas frecuentes del rodeo (Campero y col., 2003). Si bien la mayoría de los abortos por el VDVB ocurre durante la gestación temprana, no debe descartarse su importancia como causa de muerte en gestaciones avanzadas o en mortalidad neonatal (Grooms, 2004; Ridpath, 2010).

Todas las cepas del VDVB pueden presentar los biotipos ncp y cp, predominando el ncp en la naturaleza (Ridpath, 2010; Neill, 2013). De las 55 cepas detectadas por AV en este estudio (27 en sueros y 28 en fetos/neonatos), sólo una correspondió al biotipo cp. Esta cepa fue aislada en el bazo de un neonato de 1-2 días de edad (caso 13-464; Tabla 10) junto al biotipo ncp, que fue aislado en plasma del mismo animal (muestra no incluida en este estudio). La detección del biotipo cp es más frecuente en animales PI de 6 a 18 meses de edad que desarrollan EM o en casos asociados al uso de vacunas vivas (Ridpath, 2010). Por lo tanto, la identificación de este biotipo en un neonato es un hallazgo poco usual. Si bien no pudo determinarse el origen de esta cepa cp, se hipotetiza que pudo generarse a partir del biotipo ncp por una mutación o recombinación genética inusualmente temprana o que la transmisión de la cepa cp haya sido desde un animal cursando EM. Se descarta un origen vacunal ya que en el país no está permitido el uso de vacunas vivas. Previamente se informó el aislamiento del biotipo cp en dos casos (un feto y un neonato; Jones y col., 2001) y un neonato de 10 días (Laureyns y col., 2011) aunque el biotipo ncp no fue detectado en ninguno de ellos.

El análisis del porcentaje de acuerdo y concordancia entre AV, ELISAag, RT-nPCR y RT-qPCR en muestras de 95 fetos abortados y neonatos bovinos (Tabla 13) muestra elevados niveles de %_{neg} (mayores a 80) entre las técnicas, lo que se condice con similares niveles de Es (86,4 a 100%). En este sentido, la posibilidad de arrojar resultados falsos negativos es comparable entre el ELISAag y las técnicas de RT-PCR. Al mismo tiempo, la Es de las técnicas moleculares podría estar subestimada ya que este método puede detectar ARN aún a partir del virus inactivado y por ende sin capacidad infectiva, siendo esta condición necesaria para obtener resultados positivos con AV, técnica que fue utilizada como prueba de referencia. Por el contrario, el %_{pos} fue bajo a moderado (34,1 a 77,4) como consecuencia de los diferentes niveles de Se entre las técnicas, observándose la mayor Se

para RT-qPCR y la menor para ELISAag. Asimismo, esta diferencia en los valores de Se generó niveles de concordancia AC1 débil a moderado.

La técnica ELISA no es utilizada rutinariamente para la identificación del VDVB en muestras fetales (Packianathan y col., 2017). El *kit* de ELISAag comercial utilizado en este trabajo fue la técnica que mostró el peor desempeño, tanto el porcentaje de detección como la Se fueron menores al resto de los métodos. Estos factores explican la concordancia moderada y el bajo %_{pos} en las comparaciones que incluyeron al ELISAag. El método requiere que el antígeno permanezca estable (Ridpath y col., 2009), por lo que los falsos negativos pudieron ser causados por la degradación proteica producto de la autólisis (Sandvik y col., 2001) o del prolongado periodo de almacenamiento (hasta 22 años). No obstante, en este trabajo tres muestras conservadas desde 1998 y 1999 resultaron positivas al ELISAag; mientras que muestras más recientes, 2017 y 2018 por ejemplo, fueron negativas. Por lo tanto, el pobre desempeño del ELISAag estaría afectado en mayor medida por la autólisis o contaminación de las muestras y en menor medida por el tiempo de almacenamiento de estas. Estudios previos también observaron menor sensibilidad del ELISAag en comparación con RT-PCR en la detección del VDVB en muestras de fetos abortados (Horner y col., 1995; Dehkordi, 2011). Por otra parte, Graham y col. (2009) obtuvieron un buen desempeño y elevada concordancia (97,1%) entre RT-qPCR y ELISAag en muestras de fluidos fetales, pero a diferencia del presente estudio, el periodo de muestreo fue de solo 9 meses. En resumen, el ELISAag parece ser una técnica poco apropiada para especímenes con autólisis, como generalmente presentan los tejidos fetales, o para realizar estudios retrospectivos. En el presente trabajo se utilizaron muestras de bazo y ocasionalmente cerebro y pulmón, de acuerdo con el tipo de muestra recomendada por el fabricante, aunque el fluido de cavidades fetales (Graham y col., 2009) o la piel (Ridpath y col., 2009) serían muestras más adecuadas para utilizar con esta técnica.

En cuanto a los métodos moleculares, RT-qPCR presentó mayor Se (+13,8 unidades porcentuales) respecto a RT-nPCR con similares niveles de Es. Sin embargo, la Se estimada para ambas RT-PCR fue menor a lo esperado según lo hallado por otros autores (Horner y col., 1995; Hyndmann y col., 1998; Graham y col., 2009). La Se obtenida en este trabajo podría estar subestimada por lo antes planteado respecto al empleo del AV como prueba de referencia. El AV se realizó en el momento de recepción de las muestras, lo que pudo representar ventajas en cuanto a las condiciones de conservación de estas respecto al resto de las técnicas realizadas hasta 22 años después. En relación con lo planteado, la presencia de inhibidores, contaminantes (Hamel y col., 1995; Ridpath y col., 2014) o la degradación del ARN (Graham y col., 2009) durante el período de almacenamiento pueden explicar la moderada Se de las pruebas moleculares. En este sentido, las muestras con AV presentaron menores valores de Cq que aquellas sin AV, sugiriendo mayor carga viral en las

primeras. Sin embargo, 3 casos con previo AV resultaron negativos con ambas técnicas de RT-PCR evaluadas y con RT-PCR utilizando los oligonucleótidos *pan-pestivirus* 324-326 para el análisis filogenético (Sección 4).

Ridpath y col. (2014) observaron que contaminantes presentes en muestras fetales archivadas durante 36 meses redujeron significativamente la detección del VDVB por RT-PCR. No obstante, en este trabajo se detectó ARN viral en muestras almacenadas hasta por 21 años a -80 °C, demostrando que el ARN del VDVB puede ser estable durante largos periodos de tiempo en condiciones de almacenamiento adecuadas. Del mismo modo, los resultados obtenidos permiten afirmar que las técnicas moleculares son una herramienta valiosa para realizar estudios retrospectivos o bien para su implementación en muestras con alto grado de autólisis. Igualmente, es recomendable remover los contaminantes ambientales que pudieran estar presentes en una muestra previo a su almacenamiento por largos periodos de tiempo (Ridpath y col., 2009).

El %_{pos} y la concordancia entre ambas RT-PCR fueron moderados, consecuencia de la discrepancia observada en 15 muestras. De estas, 11 fueron positivas a RT-qPCR y negativas a RT-nPCR, observándose lo contrario en las otras 4. Las causas de esta discrepancia no son claras. Una posibilidad sería que la RT-qPCR presente mayor límite de detección que la RT-nPCR, aunque este límite fue el mismo al comparar ambas técnicas en diluciones de suero de un bovino PI (datos no mostrados) como se detalló en la Sección 1 de Materiales y Métodos. Otra razón puede estar asociada al diseño de los oligonucleótidos, los cuales amplifican diferentes regiones génicas, un fragmento de la región no codificante 5'UTR y uno de la región codificante para la proteína no estructural NS5B. Dado que ambos segmentos son considerados como regiones altamente conservadas del genoma viral (Newcomer y col., 2013; Schweizer y Peterhans, 2014), no serían esperables diferencias en la capacidad de los oligonucleótidos en identificar los diferentes subtipos detectados en el presente estudio. Una tercera explicación de la discrepancia podría estar asociada al menor tamaño de amplificación de la RT-qPCR (160 pb) comparado a la RT-nPCR (1124 pb en la primera ronda y 604 o 360 pb en la segunda ronda). La calidad del ARN puede ser afectada por la degradación *posmortem* de los tejidos, el prolongado tiempo de almacenamiento (Fleige y Pfaffl, 2006) o por la presencia de contaminantes ambientales en las muestras (Ridpath y col., 2014). En tal sentido, la amplificación de productos mayores a 400 pb es fuertemente afectada por la calidad del ARN, mientras que la eficiencia de la amplificación de fragmentos más cortos (70-250 pb) es menos dependiente de la calidad del ARN (Fleige y Pfaffl, 2006). Al respecto, en el presente trabajo menos de la mitad de las muestras mostraron relaciones de OD 260/280 superiores al valor recomendado de 1,8 (datos no mostrados). Esta situación pudo afectar la sensibilidad de la RT-nPCR para detectar al ARN viral debido al tamaño del producto a amplificar. Además, las mismas RT-PCR evaluadas en

muestras de sueros (Sección 2) mostraron concordancia, %_{pos} y %_{neg} superiores al 90%, lo que refuerza la hipótesis de que la calidad de la muestra y el tamaño del producto a amplificar pudo influir significativamente en el desempeño de las técnicas moleculares. Este fenómeno ha sido reportado al implementar RT-PCR en muestras conservadas en formol, en las cuáles el ARN viral sufre fragmentación (Gruber y col., 1994; Bhudevi y Weinstock, 2003). En base a lo previamente descrito, sería conveniente la realización de estudios adicionales para determinar si esta situación ocurre en tejidos con diferentes grados de autólisis o expuestos a condiciones ambientales adversas para la conservación de la muestra.

Los hallazgos macroscópicos observados en los casos positivos al VDVB coinciden mayormente con los descriptos previamente en infecciones naturales (Kirkbride, 1992; Anderson, 2012). En cuanto a la histopatología, la mitad de los casos presentaron lesiones leves en los tejidos evaluados. Esto se condice con otros estudios en los que se observó que la mayoría de los fetos infectados con el VDVB presentaron lesiones leves o ausencia de alteraciones microscópicas (Murray, 1991; Kirkbride, 1992). Existe escasa información sobre la relación entre la presencia de anticuerpos y lesiones histológicas asociadas al VDVB. En el presente trabajo, el 85% de los casos con AcN presentaron lesiones histológicas, mostrando una asociación entre ambos. Esta relación también fue observada en el 68% de los casos evaluados por Murray (1991). Considerando que las lesiones fetales atribuidas al VDVB son muy variables (Anderson, 2012) y que los hallazgos descriptos en este trabajo son inespecíficos, se refuerza el concepto de que la sola presencia de patología compatible es insuficiente para adjudicar al VDVB como causa de muerte fetal o neonatal. Si bien no fue un objetivo primario de este estudio, los cambios patológicos observados obtenidos aportan información a las escasas descripciones de lesiones histopatológicas en fetos y neonatos bovinos infectados naturalmente por el VDVB (Murray, 1991; Kirkbride, 1992).

La infección de una hembra gestante con el biotipo ncp del VDVB entre el día 100 y 150 de gestación puede generar diversos efectos teratogénicos en el feto, afectando comúnmente al sistema nervioso central (Grooms, 2004). También puede observarse hipotricosis, microftalmia, opacidad corneal e hipoplasia de timo (Grooms, 2004; Agerholm y col., 2015). La selección de casos en el presente trabajo se basó, entre otros criterios, en la presencia de malformaciones congénitas compatibles con la infección del VDVB. El virus fue identificado solo en el 16% (3/19) de los casos con estas alteraciones, mientras que se identificaron títulos de anticuerpos neutralizantes al VDVB en el 80% (8/10) de los fluidos de cavidad correspondientes a individuos con malformaciones. Teniendo en cuenta que la presencia de anticuerpos es indicativa de infección viral (Kirkbride y Johnson 1989; Hyndman y col., 1998), se postula que el VDVB estuvo implicado en más casos de

malformaciones que los pudieron ser confirmados en el presente trabajo. No obstante, la presencia de otras causas de alteraciones congénitas no evaluadas en este estudio como desórdenes hereditarios, toxinas o diferentes agentes infecciosos no deben ser descartadas.

Para evaluar correctamente el título de AcN mediante la técnica de SNT deberían utilizarse diferentes cepas del VDVB, que incluyan los tipos y subtipos circulantes en la región o país, con el fin de evitar subestimaciones o falsos negativos (Saliki y Dubovi, 2004; OIE, 2018). Según la bibliografía consultada, no hay estudios previos que comparen el título de AcN en fluidos de cavidad de fetos o neonatos frente a diferentes subtipos del VDVB. Para esta tesis, los subtipos -1a, -1b y -2b fueron seleccionados por ser los de mayor circulación en el país (Jones y col., 2001, 2004; Pecora y col., 2014, 2019).

La presencia de títulos de AcN al VDVB en el 94% de los fluidos analizados en esta tesis confirmaría la elevada circulación y seroprevalencia del virus en el país (Rweyemamu y col., 1990; Odeón y col., 2001; Pacheco y Lager, 2003). Otros estudios en Argentina documentaron frecuencias de anticuerpos del 2% en fetos de mataderos (Pinto y col., 1993; Muñoz y col., 1996), de 6,7% a 45,2% en fetos abortados o mortalidad neonatal (Moore y col., 2003; Rodríguez y col., 2012; Morrell y col., 2019) y 36% en lotes de suero fetal bovino no irradiado (Pecora y col., 2019). Es necesario aclarar que la mayor proporción de muestras con AcN en el presente estudio podría explicarse por los criterios de selección utilizados. En primer lugar, todos los casos fueron confirmados o sospechosos de infección por VDVB. En segundo lugar, la mayoría eran fetos cursando el tercer mes de gestación o neonatos, momento en que el bovino es inmunocompetente y por ende puede responder a la infección viral generando anticuerpos (Hansen y col., 2010).

Una elevada proporción (92%, 13/14; Tabla A7, Anexo) de fluidos provenientes de casos positivos al VDVB con título de AcN fue observada en esta tesis. Por su parte, Murray (1991) y Hyndman y col. (1998) también registraron proporciones moderadas o elevadas, 48% y 62%, de fluidos con anticuerpos obtenidos de casos de aborto o mortalidad neonatal positivos al VDVB. En cambio, Kirkbride y Johnson (1989) detectaron anticuerpos en solo el 5% de los casos con infección por el VDVB y Graham y col. (2009) reportaron la presencia de fetos seropositivos, pero negativos a la detección del VDVB, en el 1,4% de los casos evaluados. Estas diferencias en la proporción de fluidos con anticuerpos pueden ser explicadas por los diferentes métodos empleados, por la edad de los fetos o por la prevalencia real del VDVB en las poblaciones en estudio. Además, deben considerarse los criterios de selección de casos previamente mencionados en la presente tesis. El único caso negativo a AcN y positivo por RT-nPCR (13-434; Tabla A7, Anexo) pudo tratarse de un animal PI o de un animal recientemente infectado que murió antes de expresar una respuesta inmune.

La estructura epiteliochorial de la placenta bovina impide la transferencia de inmunoglobulinas hacia el feto, que permanece libre de anticuerpos maternos hasta la ingesta de calostro (Chucrí y col., 2010). Por lo tanto, se especula que los AcN detectados en los fluidos de cavidad son de origen fetal, aunque esto no puede afirmarse en el caso de los neonatos. Por otra parte, la transferencia de anticuerpos maternos al feto sería posible cuando hay lesiones placentarias, pero esta no sería significativa (Murray, 1991; Anderson, 2012). La media geométrica de AcN fue menor frente al VDVB-1a respecto a -1b y -2b, este hallazgo estaría asociado a que las vacunas disponibles en el país están basadas en el subtipo -1a (cepa Singer) y ocasionalmente en el tipo 2 (Pecora y col., 2014). Por lo tanto, la inmunidad conferida a la hembra gestante frente a VDVB-1b y -2b no sería suficiente para proteger al feto de la infección viral. Estudios previos demostraron que vacunas vivas o inactivadas conteniendo el subtipo -1a del VDVB indujeron menores títulos de anticuerpos frente al -1b, respecto al -1a (Fulton y col., 2003a; Pecora y col. 2014). La menor generación de anticuerpos vacunales frente al subtipo -1b o -2 podría asociarse a menor protección del feto frente a estos. En tal sentido, se han reportado diferencias antigénicas entre subtipos del VDVB-1 mediante neutralización cruzada, siendo menores los títulos en neutralización con cepas heterólogas respecto a las homólogas (Nagai y col., 2001; Pizarro-Lucero y col., 2006; Bachofen y col., 2008; Ridpath y col., 2010).

Debe considerarse que en la determinación de anticuerpos neutralizantes sólo se evalúa la respuesta inmune humoral, pero no se evalúa la respuesta de linfocitos T, que también juegan un papel importante en la respuesta frente a una infección con pestivirus (Endsley y col., 2003). Por lo tanto, la evaluación de anticuerpos no provee un panorama completo de la respuesta inmune de los fetos evaluados en este trabajo. A pesar de ello, el conocimiento y la comparación de los títulos de anticuerpos frente a cada subtipo brinda información acerca de las cepas del VDVB que están circulando en los rodeos bovinos de la región geográfica evaluada (Bauermann y col., 2017).

La SNT es una técnica de difícil implementación masiva dado el elevado costo y tiempo necesario para obtener resultados. La gran variabilidad existente entre laboratorios, como resultado de los diferentes sistemas celulares y cepas de referencias utilizadas en el método, dificultan la estandarización y comparación de resultados entre laboratorios (Walz y col., 2010; Dubovi, 2013). A pesar de las desventajas mencionadas, este método permite cuantificar y evaluar el título de anticuerpos en relación con la variabilidad genética de las cepas circulantes del VDVB. Esta característica, sumado a que es la técnica de referencia para evaluar métodos de detección de anticuerpos (Dubovi, 2013), hacen de la SNT una herramienta valiosa para los laboratorios de investigación, mientras que su uso puede ser limitado para el diagnóstico de rutina.

Si bien la presencia de anticuerpos en fluido fetal es indicativa de exposición viral, no significa necesariamente que el VDVB haya sido la causa de aborto (Kirkbride y Johnson, 1989; Hyndman y col., 1998). Por lo tanto, la interpretación de los títulos de AcN debería ser realizada bajo el contexto individual y de rodeo, sumado a otros hallazgos como la detección del virus, lesiones compatibles y descartando otros agentes abortigénicos (Graham y col., 2009; Anderson, 2012).

Ha sido ampliamente demostrado que la variabilidad entre las cepas vacunales y las cepas de campo puede generar fallas en la vacunación (Ridpath y Neill, 2015). En este sentido, el conocimiento de la respuesta inmunitaria de fetos y neonatos a cepas del VDVB circulantes en el país podría aportar información valiosa respecto al estado inmunitario de los rodeos y al diseño de inmunógenos con cepas locales.

SECCIÓN 4:

Caracterización genotípica de las cepas del VDVB identificadas durante el estudio

El conocimiento de los tipos y subtipos del VDVB circulantes en una región o país proporciona información valiosa para establecer y desarrollar herramientas de diagnóstico y nuevos inmunógenos para su aplicación en programas de control del virus (Ridpath, 2010). El presente trabajo evaluó la variabilidad genética de un número significativo de cepas del VDVB asociadas a bovinos aparentemente sanos y con diferentes síndromes clínicos (reproductivo, respiratorio, digestivo, infección persistente).

En coincidencia con estudios locales previos (Jones y col., 2001, 2004; Pecora y col., 2014, 2019), el tipo predominante fue el VDVB-1, identificado en el 96% (70/73) de las muestras (sueros y fetos/neonatos), en tanto que el VDVB-2 fue identificado en el 4% (3/73). El análisis filogenético de las regiones genómicas 5'UTR y NS5B mostró que el subtipo -1b fue detectado con mayor frecuencia respecto al -1a o -2b. Esto también fue observado en dos estudios previos que implicaron el análisis de 30 cepas obtenidas de diferentes cuadros clínicos en el periodo 2003-2010 (Pecora y col., 2014) y de 49 cepas obtenidas de suero fetal bovino entre 2014 y 2016 (Pecora y col., 2019). Por otra parte, Jones y col. (2001) identificaron con mayor frecuencia al subtipo -1a entre 1984 y 1999. Las vacunas disponibles en Argentina están basadas mayormente en el subtipo -1a. De acuerdo con lo planteado por Pecora y col. (2014), esta situación pudo generar una presión de selección favoreciendo el predominio de -1b entre 1998-2018. Asimismo, el mayor título de AcN en fluidos de fetales frente a -1b y -2b podría indicar que las vacunas utilizadas en el país, formuladas con cepas de referencia del VDVB-1a, no generan una protección adecuada frente a la infección viral por estos subtipos. Estos datos refuerzan la propuesta de incorporar cepas representativas del VDVB-1b en vacunas nacionales (Pecora y col., 2014, 2019).

El análisis de identidad de a pares de las secuencias del 5'UTR obtenidas en este trabajo mostró mayor variabilidad en el subtipo -1a respecto al -1b del VDVB. Esto también fue observado por Jones y col. (2001) con cepas argentinas detectadas en el periodo 1984-1999; mientras que Pecora y col., (2014, 2019) hallaron mayor variabilidad del VDVB-1b respecto al -1a durante los periodos 1998-2010 y 2014-2016. Al considerar todas las secuencias disponibles de origen argentino, de 1984 a 2019, el fragmento 5'UTR mostró mayor variabilidad en el subtipo -1a. Con el objetivo de ampliar la caracterización genética del VDVB en el país, se estudió la dinámica evolutiva y demográfica del VDVB-1a y -1b a través de metodología bayesiana. El estudio se enfocó en estos subtipos dado que son los

más frecuentes en Argentina. Es necesario remarcar que el 85% a 90% de las secuencias correspondieron a cepas detectadas en la provincia de Buenos Aires, por lo que los resultados obtenidos no necesariamente representan a cepas de otras regiones del país.

Mediante el análisis de mapeo de verosimilitud se determinó que ambos subtipos presentan diferente estructura filogenética. En el caso del conjunto de secuencias de -1a, se observó una topología *tree-like*, consistente con la formación de diversos subclados soportados estadísticamente, lo que indica una estructura de diferentes poblaciones filogenéticas dentro de este subtipo. Por el contrario, el subtipo -1b reveló una estructura *star-like* en concordancia con la presencia de politomias y falta de soporte estadístico. Estos hallazgos, junto a los altos porcentajes de identidad por pares, indican que el fragmento genómico analizado presenta una limitada diversidad genética en el VDVB-1b. Por lo tanto, el 5'UTR no sería una región con suficiente información filogenética para inferir la relación evolutiva entre clados o linajes del subtipo -1b en Argentina. Debido a lo expuesto, deberían analizarse otras regiones genómicas como el Npro, E2 o la combinación de estas con el 5'UTR (Vilcek y col., 2001; Toplak y col., 2004; Liu y col., 2009). En este sentido, Chernick y col. (2014) obtuvieron mayor señal filogenética y mejor soporte estadístico al utilizar un fragmento de la región genómica E1-E2 respecto al uso del 5'UTR en el estudio del VDVB-1a. En Argentina, Pecora y col. (2014) obtuvieron topologías definidas y con altos valores de *bootstrap* utilizando secuencia de la región E2 de aislamientos del VDVB-1b, que además conformaron un clado apartado de las cepas -1b de otros países. Vale aclarar que la región 5'UTR de las cepas argentinas utilizadas por Pecora y col. (2014) fueron incluidas en los análisis de esta tesis.

Liu y col., (2009) estimaron el tMRCA del género *Pestivirus* mediante el análisis combinado de las secuencias de las regiones genómicas 5'UTR, Npro y E2 de cepas de referencia. En ese estudio determinaron que el VDVB-1 fue el primero en emerger, alrededor de 1802, seguido por el VDVB-3 en 1880 y el VDVB-2 en 1890. Desde entonces, el VDVB-1 se ha propagado y detectado en todo el mundo (Liu y col., 2009; Yesilbag y col., 2017). En la presente tesis, el tMRCA estimado y su intervalo coinciden con los resultados encontrados para diversos subtipos del VDVB-1 en países como Italia (Luzzago y col., 2012; Cerutti y col., 2016; Ebranati y col.; 2018), Canadá (Chernick y col., 2014; Chernick y van der Meer, 2017) y China (Wang y col., 2020). Las estimaciones del tMRCA sugieren que el subtipo -1a comenzó a circular en el país en 1953, poco antes que el -1b en 1961. Esta estimación es consistente con las primeras descripciones clínicas de la enfermedad en 1964 (Rweyemamu y col., 1990). Posteriormente, en 1979 se reportaron los primeros resultados serológicos y en 1984 se logró el primer aislamiento del virus (Rweyemamu y col., 1990). La evidencia de que el VDVB-1a comenzó a diversificarse antes que el -1b coincide con lo informado en el primer estudio filogenético en Argentina, en el cual se detectó al -1a con

mayor frecuencia que el -1b previo al año 2000 (Jones y col., 2001), situación que se ha modificado desde entonces hasta la actualidad, siendo el subtipo -1b más frecuente (Jones y col., 2004; Pecora y col., 2014, 2019). Podría asumirse que el mayor tiempo de circulación del VDVB-1a en el país llevó a un proceso de evolución local del virus y en consecuencia a la mayor diversidad genética y tasa de sustitución nucleotídica respecto al -1b. Estas conclusiones deben ser consideradas con precaución ya que el intervalo de la estimación del tMRCA para ambos subtipos fue amplio (alrededor de 80 años) y superpuesto (-1a: 1899-1980; -1b: 1900-1982). La obtención de secuencias de cepas virales más antiguas, de periodos de tiempo más prolongados y la inclusión de otras regiones genómicas mejoraría estas estimaciones.

La tasa de sustitución nucleotídica estimada en esta tesis se encontró dentro del rango de 10^{-2} a 10^{-5} s/s/a informado para los virus ARN (Jenkins y col., 2002), con la mayoría de ellos en el orden de 10^{-3} s/s/a (Duffy y col., 2008). Diversos subtipos del VDVB-1 también presentaron tasas de sustitución en la región 5'UTR del orden de 10^{-3} (Luzzago y col., 2012; Wang y col., 2020). De acuerdo con el porcentaje de identidad de a pares y la reconstrucción demográfica, el subtipo -1a presentó una tasa de sustitución más rápida que la del -1b ($1,88 \times 10^{-3}$ vs. $4,26 \times 10^{-4}$) sin superposición del HPD95%. Esta diferencia podría estar asociada a características inherentes a las cepas locales de cada subtipo o a otros factores como la inmunidad del huésped o el comportamiento epidemiológico de cada subtipo (Volz y col., 2013). La tasa de sustitución más rápida del VDVB-1a también podría ser consecuencia de la presión de selección del uso de vacunas, las cuales están formuladas con el subtipo -1a. Dado que el 5'UTR no es codificante y es una de las regiones más conservadas del genoma de los *Pestivirus* (Hamers y col., 2001), no está claro si se encuentra sometida a la presión de selección del sistema inmune. Por el contrario, la glicoproteína de superficie E2 es el principal blanco de la respuesta inmune humoral y una de las regiones genómicas más variables (Ridpath, 2003; Neill, 2013). Por lo tanto, el estudio de este gen contribuiría a ampliar el conocimiento del proceso evolutivo de ambos subtipos en Argentina y en particular podría aportar información del comportamiento de los subtipos virales frente a la respuesta inmunitaria vacunal.

Los gráficos *Bayesian Skyline* mostraron algunas diferencias en la evolución demográfica entre subtipos. El VDVB-1a presentó un aumento exponencial de su diversidad genética aproximadamente entre 1998-2002, situación que podría explicarse por un aumento en la dispersión del -1a previo a ese período. Sin embargo, esto es especulativo y no se cuenta con la información epidemiológica suficiente para corroborarlo. La diversificación exponencial del VDVB-1a condice con lo observado en el árbol filogenético, con la formación de dos subclados principales, uno conteniendo 35 secuencias y el otro con 10 secuencias. Es interesante notar que en ambos subclados hay secuencias obtenidas

antes y después del periodo 1998-2002, sugiriendo que las cepas más antiguas dieron origen a dos grandes grupos del VDVB-1a, que estarían actualmente circulando en el país. Esto implica la necesidad de profundizar los estudios genéticos y antigénicos para comprobar si esta diversificación tiene implicancias en la eficacia de las vacunas disponibles. Por otra parte, la diversidad del VDVB-1b se ha mantenido constante desde mediados de la década del 80, a pesar de ser detectado más frecuentemente que el subtipo -1a después del año 1999 (Jones y col., 2004; Pecora y col., 2014, 2019). Esto condice con la tasa de sustitución (en el orden de 10^{-4}) más lenta respecto a la del -1a (en el orden de 10^{-3}).

Aunque cada subtipo presentó algunas características particulares en la reconstrucción demográfica, la diversidad genética se mantuvo constante por largos períodos de tiempo en ambos subtipos, particularmente en la última década. Esto confirma la naturaleza endémica del VDVB-1a y -1b en Argentina, previamente descrita en estudios serológicos (Rweyemamu y col., 1990; Odeón y col., 2001; Pacheco y Lager, 2003). En ninguno de los subtipos se observó una disminución de la diversidad, lo que indicaría que la prevalencia y la diversidad genética del VDVB no ha disminuido en ningún momento desde su origen en el país. Esto refuerza el concepto de que la vacunación por sí sola no es una herramienta suficiente para controlar al virus y es necesario complementarla con la eliminación de animales PI y medidas de bioseguridad (Walz y col., 2010).

Los resultados obtenidos en este y en otros estudios (Jones y col., 2001, 2004; Pecora y col., 2014, 2019) muestran que la frecuencia de los subtipos del VDVB en Argentina se mantiene estable desde 1984, con predominio de los subtipos -1a y -1b, seguidos por los subtipos -2b y -2a. Además, se han identificado esporádicamente al subtipo -1i (Laboratorio Virología Animal EEA INTA Balcarce, datos sin publicar), -1j (Jones y col., 2001, 2004) y la especie Hobi-like (Pecora y col., 2019). En esta tesis se caracterizó por primera vez la dinámica de los dos subtipos del VDVB de mayor circulación en el país. Debe considerarse que estas estimaciones están basadas en solo un fragmento del genoma viral, por lo que más secuencias de otras regiones genómicas y de otras cepas virales mejorarán las estimaciones presentadas. La inclusión de cepas virales obtenidas de diferentes regiones del país y la combinación con datos epidemiológicos permitirá una mayor integración de la información generada.

Resulta evidente la necesidad de contar con un monitoreo continuo de la variabilidad genética del VDVB ante la posible introducción de nuevos subtipos que podrían tener impacto negativo en la eficacia de los métodos de diagnóstico y en las vacunas utilizadas en el país, sin dejar de tener en cuenta el posible impacto negativo de cepas con mayor virulencia para la ganadería bovina. Asimismo, el conocimiento de la variabilidad genética y

dinámica poblacional del VDVB puede jugar un papel esencial en la evaluación a corto y largo plazo de medidas de control de la enfermedad.

CONCLUSIONES

En esta tesis se evaluó y adaptó una técnica de RT-nPCR para la detección y tipificación del VDVB en muestras de suero bovino. El alto límite de detección permitió su empleo tanto en sueros individuales como en *pools*, lo que la hace una técnica útil para su aplicación en forma masiva para programas de saneamiento del VDVB. Al respecto, durante el desarrollo de la presente tesis se analizaron 2864 sueros bovinos pertenecientes a 55 establecimientos ganaderos, resultando en una prevalencia de infectados por el VDVB del 1% a nivel individual y del 20% a nivel predial. Si bien estos análisis no se realizaron en el marco de un diseño epidemiológico, los datos obtenidos aportan información valiosa a los escasos conocimientos de la prevalencia del VDVB en Argentina. Por otra parte, se comprobó el buen desempeño de la RT-nPCR en muestras de fetos abortados y mortalidad neonatal que frecuentemente presentan alto grado de autólisis o contaminación ambiental.

Ambas técnicas moleculares (RT-nPCR y RT-qPCR) mostraron una concordancia fuerte a casi perfecta en la detección del VDVB en muestras de suero. En tanto que el método del FAL-ELISA detectó mayor proporción de sueros positivos, posiblemente asociado a falsos positivos debido a interferencia de la muestra de suero. Vale destacar que este método inmunoenzimático es un desarrollo local que podría contribuir al control de la enfermedad cuando culminen los estudios para su optimización.

En cuanto a la detección del VDVB en muestras fetales puede concluirse que el uso de técnicas moleculares resultó más adecuado que el método de ELISAag comercial. El nivel de Se fue menor a lo esperado en ambas RT-PCR; sin embargo, por estas técnicas se detectó el genoma viral en muestras conservadas por hasta 21 años. Teniendo en cuenta alguna de estas limitaciones, el uso de técnicas moleculares debe considerarse como una herramienta valiosa en especímenes con avanzado grado de autólisis o en estudios retrospectivos. Estas técnicas deberían incluirse de rutina en los protocolos de diagnóstico de pérdidas reproductivas asociadas al VDVB.

El estudio filogenético de las cepas del VDVB obtenidas durante el desarrollo de esta tesis confirma la circulación de los subtipos -1a, -1b y -2b en el país, con predominio del VDVB-1b. La detección de AcN en una elevada proporción de los fluidos fetales demuestra la alta circulación del VDVB y refuerza el rol de este virus como causa importante de pérdidas reproductivas para la ganadería bovina para carne y leche nacional. El estudio de filodinamia reveló mayor variabilidad genética de la región 5'UTR del VDVB-1a respecto al -1b, aunque ambos mostraron una diversidad genética casi constante, particularmente en la última década, lo que muestra la naturaleza endémica del VDVB en el país.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que se dispone de técnicas de diagnóstico sensibles y específicas para la detección del VDVB en diversos tipos de

muestras; no obstante, también resulta importante la transferencia y capacitación sobre las alternativas de control de la enfermedad, tanto para los profesionales del sector como para los productores ganaderos. De esta manera, su aplicación realizada en un contexto adecuado permitirá la implementación de programas de saneamiento efectivos con los beneficios económicos del caso.

BIBLIOGRAFÍA

- Agerholm, J.S.; Hewicker-Trautwein, M.; Peperkamp, K.; Windsor, P.A. (2015) Virus-induced congenital malformations in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57: 54.
- Al-Soud, W.A.; Rådström, P. (1998) Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3748-3753.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Álvarez, M.; Donate, J.; Makoschey, B. (2012) Antibody responses against non-structural protein 3 of bovine viral diarrhoea virus in milk and serum samples from animals immunised with an inactivated vaccine. *The Veterinary Journal*, 191: 371-376.
- Anderson, M.L. (2007) Infectious causes of bovine abortion during mid-to late-gestation. *Theriogenology*, 68: 474-486.
- Anderson, M.L. (2012) Disorders of cattle, En: Njaa, B.L. Kirkbride's diagnosis of abortion and neonatal loss in animals. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. Cuarta Edición Capítulo 2: 13-48.
- Bachofen, C.; Stalder, H.; Braun, U.; Hilbe, M.; Ehrensperger, F.; Peterhans, E. (2008) Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Veterinary Microbiology*, 131: 93-102.
- Bachofen, C.; Willoughby, K.; Zadoks, R.; Burr, P.; Mellor, D.; Russell, G.C. (2013) Direct RT-PCR from serum enables fast and cost-effective phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virological Methods*, 190: 1-3.
- Baele, G.; Lemey, P.; Bedford, T.; Rambaut, A.; Suchard, M.A.; Alekseyenko, A.V. (2012) Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 2157-2167.
- Baele, G.; Li, W.L.S.; Drummond, A.J.; Suchard, M.A.; Lemey, P. (2013) Accurate model selection of relaxed molecular clocks in Bayesian phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 239-243.
- Baker, J.C. (1995) The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 11: 425-445.
- Bauermann, F.V.; Flores, E.F.; Ridpath, J.F. (2012) Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24: 253-261.

- Bauermann, F.V.; Ridpath, J.F.; Dargatz, D.A. (2017) A serosurvey for ruminant pestivirus exposure conducted using cattle sera collected for brucellosis surveillance in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29: 76-82.
- Bauermann, F.V.; Ridpath, J.F.; Weiblen, R.; Flores, E.F. (2013) HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25: 6-15.
- Beaudeau, F.; Belloc, C.; Seegers, H.; Assie, S.; Sellal, E.; Joly, A. (2001) Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. *Veterinary Microbiology* 80, 329-337.
- Bhudevi, B.; Weinstock, D. (2003) Detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). *Journal of Virological Methods*, 109: 25-30.
- Bianchi, M.V.; Konradt, G.; De Souza, S.O.; Bassuino, D.M.; Silveira, S.; Mósena, A.C.S.; Pavarini, S.P.; Driemeier, D.; Driemeier, D. (2017) Natural outbreak of BVDV-1d-induced mucosal disease lacking intestinal lesions. *Veterinary Pathology*, 54: 242-248.
- Bielanski, A.; Algire, J.; Lalonde, A.; Nadin-Davis, S. (2009) Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology*, 71: 499-508.
- Bolin, S.R. (1990) The current understanding about the pathogenesis and clinical forms of BVD. *Vet-Med. Lenexa, Kan. Veterinary Medicine Publishing Company*, 85: 1124-1132.
- Bolin, S.R., Ridpath, J.F. (1998) Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10: 135-139.
- Brock, K.V. (1995) Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 11: 549-561.
- Brock, K.V.; Grooms, D.L.; Givens, M.D. (2005) Reproductive disease and persistent infections. En: Goyal, S.M.; Ridpath, J.F. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*. Ames, IA: Blackwell Publishing. First Edition. Chapter 8: 145-156.
- Brock, K.V.; Grooms, D.L.; Ridpath, J.; Bolin, S.R. (1998) Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10: 22-26.
- Brodersen, B.W. (2014) Bovine viral diarrhoea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Veterinary Pathology*, 51: 453-464.
- Brownlie, J. (1990) Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*, 23: 371-382.

- Brownlie, J.; Clarke, M.C.; Howard, C.J.; Pocock, D.H. (1987) Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Annale de Recherches Veterinaires*, 18: 157-166.
- Cabbel, E. (2007) Bovine abortion: aetiology and investigations. *In Practice*, 29: 455-463.
- Campero, C.M.; Moore, D.P.; Odeón, A.C.; Cipolla, A.L.; Odriozola, E. (2003) Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Veterinary Research Communications*, 27: 359-369.
- Capozzo A.V.; Martinez, M.R.; Schielen, W.J. (2010) Development of an in process control filtration-assisted chemiluminometric immunoassay to quantify foot and mouth disease virus (FMDV) non-capsid proteins in vaccine-antigen batches. *Vaccine*, 28: 6647-6652.
- Carpenter, T.E.; Chrièl, M.; Andersen, M.M.; Wulfson, L.; Jensen, A.M.; Houe, H.; Greiner, M. (2006) An epidemiologic study of late-term abortions in dairy cattle in Denmark, July 2000-August 2003. *Preventive Veterinary Medicine*, 77: 215-229.
- Cerutti, F.; Luzzago, C.; Lauzi, S.; Ebranati, E.; Caruso, C.; Masoero, L.; Moreno, A.; Acutis, P.L.; Zehender, G.; Peletto, S. (2016) Phylogeography, phylodynamics and transmission chains of bovine viral diarrhoea virus subtype 1f in Northern Italy. *Infection, Genetics and Evolution*, 45: 262-267.
- Chamorro, M.F.; Passler, T.; Givens, M.D.; Edmondson, M.A.; Wolfe, D.F.; Walz, P.H. (2011) Evaluation of transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) between persistently infected and naive cattle by the horn fly (*Haematobia irritans*). *Veterinary Research Communications*, 35:123-129.
- Chase, C.C.L.; Elmowalid, G.; Yousif, A.A.A. (2004) The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*. 20: 95-114.
- Chernick, A.; Godson, D.L.; van der Meer, F. (2014) Metadata beyond the sequence enables the phylodynamic inference of bovine viral diarrhoea virus type 1a isolates from Western Canada. *Infection, Genetics and Evolution*, 28: 367-374.
- Chernick, A.; van der Meer, F. (2017) Evolution of Bovine viral diarrhoea virus in Canada from 1997 to 2013. *Virology*, 509: 232-238.
- Chucrí, T.M.; Monteiro, J.M.; Lima, A.R.; Salvadori, M.L.B.; Junior, J.K.; Miglino, M.A. (2010) A review of immune transfer by the placenta. *Journal of reproductive immunology*, 87: 14-20.
- Cicchetti, D.V.; Feinstein, A.R. (1990) High agreement but low kappa: II. Resolving the paradoxes. *Journal of Clinical Epidemiology*, 43; 551-558.
- Cleveland, S.M.; Salman, M.D.; Van Campen, H. (2006) Assessment of a bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA and a microtiter virus isolation ELISA using pooled ear notch and serum samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18: 395-398.

- Clothier, K.; Anderson, M. (2016) Evaluation of bovine abortion cases and tissue suitability for identification of infectious agents in California diagnostic laboratory cases from 2007 to 2012. *Theriogenology*, 85: 933-938.
- Cornish, T.E.; van Olphen, A.L.; Cavender, J.L.; Edwards, J.M.; Jaeger, P.T.; Vieyra, L.L.; Woodard, L.F.; Miller, D.R.; O'Toole, D. (2005) Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17: 110-117.
- Craig, M.I.; König, G.A.; Benitez, D.F.; Draghi, M.G. (2015) Molecular analyses detect natural coinfection of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) with bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) in serologically negative animals. *Revista Argentina de Microbiología*, 47: 148-151.
- Craig, M.I.; Venzano, A.; König, G.; Morris, W.E.; Jimenez, L.; Julia, S.; Capellino, F.; Blanco Viera, J.; Weber, E.L. (2008) Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Research in Veterinary Science*, 85: 194-196.
- Da Silva Cardoso Pinto, V.; Alves, M.F.; de Souza Nunes Martins, M.; Basso, A.C.; Tannura, J.H.; Pontes, J.H.F.; SantosLima, M.; Garcia da Silva, T.; Okuda, L.H.; Stefano, E.; Romaldini, A.H.C.N.; Arnold, D.R.; Pituco, E.M. (2017) Effects of oocytes exposure to bovine diarrhoea viruses BVDV-1, BVDV-2 and Hobi-like virus on *in vitro*-produced bovine embryo development and viral infection. *Theriogenology*, 97: 67-72.
- Daves, L.; Yimer, N.; Arshad, S.S.; Sarsaifi, K.; Omar, M.A.; Yusoff, R.; Haron, A.W.; Abdullah, F.F.J. (2016) Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection and associated risk factors in cattle in Selangor, Malaysia. *Veterinary Medicine Open Journal*, 1: 22-28.
- Dehkordi, F.S. (2011) Prevalence study of Bovine viral diarrhoea virus by evaluation of antigen capture ELISA and RT-PCR assay in Bovine, Ovine, Caprine, Buffalo and Camel aborted fetuses in Iran. *AMB Express*, 1: 1-6.
- Deregt, D.; Carman, P.S.; Clark, R.M.; Burton, K.M.; Olson, W.O.; Gilbert, S.A. (2002) A comparison of polymerase chain reaction with and without RNA extraction and virus isolation for detection of bovine viral diarrhoea virus in young calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14: 433-437.
- Donis, R.O. (1995) Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Veterinary Clinics of North America*, 11: 393-423.
- Driskell, E.A.; Ridpath, J.F. (2006) A survey of bovine viral diarrhoea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18: 600-605.

- Drummond, A.J.; Rambaut, A.; Shapiro, B.; Pybus, O.G. (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1185-1192.
- Dubovi, E.J. (2013) Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41: 8-13.
- Duffell, S.J.; Sharp, M.W.; Winkler, C.E.; Terlecki, S.; Richardson, C.; Done, J.T.; Roeder, P.L.; Hebert, C.N. (1984) Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus induced fetopathy in cattle: Efficacy of prophylactic maternal pre-exposure. *The Veterinary Record*, 114: 558-561.
- Duffy, S.; Shackelton, L.A.; Holmes, E.C. (2008) Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, 9: 267.
- Duncan, A.J.; Gunn, G.J.; Humphry, R.W. (2016) Difficulties arising from the variety of testing schemes used for bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Veterinary Record*, 178. [\[https://doi.org/10.1136/vr.103329\]](https://doi.org/10.1136/vr.103329) consultado 4 de Diciembre 2019.
- Ebranati, E.; Lauzi, S.; Cerutti, F.; Caruso, C.; Masoero, L.; Moreno, A.; De Mia, G.M.; Peletto, S.; Zehender, G.; Luzzago, C. (2018) Highlighting priority areas for bovine viral diarrhoea control in Italy: a phylogeographic approach. *Infection, Genetics and Evolution*, 58: 258-268.
- Edmondson, M.A.; Givens, M.D.; Walz, P.H.; Gard, J.A.; Stringfellow, D.A.; Carson, R.L. (2007) Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19: 376-381.
- Ellis, J.A.; Martin, K.; Norman, G.R.; Haines, D.M. (1995) Comparison of detection methods for bovine viral diarrhoea virus in bovine abortions and neonatal death. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7: 433-436.
- Endsley, J.J.; Roth, J.A.; Ridpath, J. Neill, J. (2003). Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals*, 31: 123-125.
- Espy, M.J.; Uhl, J.R.; Sloan, L.M.; Buckwalter, S.P.; Jones, M.F.; Vetter, E.A.; Yao, J.D.C.; Wengenack, N.L.; Rosenblatt, J.E.; Cockerill III, F.R.; Smith, T.F. (2006) Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 165-256.
- Evans, C.A.; Pinior, B.; Larska, M.; Graham, D.; Schweizer, M.; Guidarini, C.; Decaro, N.; Ridpath, J.; Gates, M.C. (2019) Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transboundary and emerging diseases*, 66: 640-652.
- Fernández, F.; Costantini, V.; Barrandeguy, M.; Parreno, V.; Schiappacassi, G.; Maliandi, F.; Leunda, M.; Odeón, A. (2009) Evaluation of experimental vaccines for bovine viral diarrhoea in bovines, ovines and guinea pigs. *Revista Argentina de Microbiología*, 41: 86-91.

- Fernández, M.E.; Campero, C.M.; Morrell, E.; Cantón, G.J.; Moore, D.P.; Cano, A.; Malena, R.; Odeón, A.C.; Paolicchi, F.; Odriozola, E.R. (2007) Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, natimortos y neonatos: casuística del período 2006-2007. *Revista de Medicina Veterinaria*, 88: 246-254.
- Fleige, S.; Pfaffl, M.W. (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 126-139.
- Fulton, R.W.; Hessman, B.E.; Ridpath, J.F.; Johnson, B.J.; Burge, L.J.; Kapil, S.; Braziel, B.; Kautz, K.; Reck, A. (2009a) Multiple diagnostic tests to identify cattle with bovine viral diarrhoea virus and duration of positive test results in persistently infected cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73: 117-124.
- Fulton, R.W.; Ridpath, J.F.; Confer, A.W.; Saliki, J.T.; Burge, L.J.; Payton, M.E. (2003a) Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals* 31, 89-95.
- Fulton, R.W.; Step, D.L.; Ridpath, J.F.; Saliki, J.T.; Confer, A.W.; Johnson, B.J.; Briggs, R.E.; Hawley, R.V.; Burge, L.J.; Payton, M.E. (2003b). Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and *Mannheimia haemolytica* bacterin-toxoid. *Vaccine* 21, 2980-2985.
- Fulton, R.W.; Whitley, E.M.; Johnson, B.J.; Ridpath, J.F.; Kapil, S.; Burge, L.J.; Cook, B.J.; Confer, A. W. (2009b) Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73: 283-291.
- Fux, R.; Wolf, G. (2012) Transient elimination of circulating bovine viral diarrhoea virus by colostral antibodies in persistently infected calves: a pitfall for BVDV-eradication programs. *Veterinary Microbiology*, 161: 13-19.
- Gates, M.C.; Woolhouse, M.E.J.; Gunn, G.J.; Humphry, R.W. (2013) Relative associations of cattle movements, local spread, and biosecurity with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) seropositivity in beef and dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 112: 285-295.
- 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*, 43: 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. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70: 571-580.
- Gilbert, S.A.; Burton, K.M.; Prins, S.E.; Deregt, D. (1999) Typing of bovine viral diarrhoea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2020-2023.

- Givens, M.D., Heath, A.M., Brock, K.V., Brodersen, B.W., Carson, R.L., Stringfellow, D.A. (2003) Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *American Journal of Veterinary Research*, 64: 428-434.
- González Altamiranda, E. (2013) Mecanismos de interacción del virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) en la utilización de biotécnicas reproductivas a campo e *in vitro*. (Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina. 159 p.
- González Altamiranda, E.G.; Kaiser, G.G.; Weber, N.; Leunda, M.R.; Pecora, A.; Malacari, D.A.; Morán, O.; Campero, C.M.; Odeón, A.C. (2012) Clinical and reproductive consequences of using BVDV-contaminated semen in artificial insemination in a beef herd in Argentina. *Animal Reproduction Science*, 133: 146-152.
- González, A.M.; Arnaiz, I.; Yus, E.; Eiras, C.; Sanjuán, M.; Diéguez, F.J. (2014) Evaluation of long-term antibody responses to two inactivated bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vaccines. *The Veterinary Journal*, 199: 424-428.
- Graham, D.A.; Beggs, N.; Mawhinney, K.; Calvert, V.; Cunningham, B.; Rowan-Layberry, L.; McLaren, I. (2009) Comparative evaluation of diagnostic techniques for bovine viral diarrhoea virus in aborted and stillborn fetuses. *Veterinary Record*, 164: 56-58.
- Graham, D.A.; German, A.; Mawhinney, K.; Goodall, E.A. (2003) Antibody responses of naive cattle to two inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines, measured by indirect and blocking ELISAs and virus neutralisation. *Veterinary Record*, 152: 795-800.
- Graham, D.A.; Mawhinney, K.A.; Mc Shane J.; Connor, T.J.; Adair, B.M.; Merza, M. (1997) Standardization of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for quantitative estimation of antibodies specific for infectious bovine rhinotracheitis virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9: 24-31.
- Grooms, D.L. (2004) Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 20: 5-19.
- Gruber, A.D.; Moennig, V.; Hewicker-Trautwein, M.; Trautwein, G. (1994) Effect of formalin fixation and long-term storage on the detectability of bovine viral diarrhoea-virus (BVDV) RNA in archival brain tissue using polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medicine*, 41: 654-661.
- Guindon, S.; Dufayard, J.F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59: 307-321.
- Gunn, G.J.; Stott, A.W.; Humphry, R.W. (2004) Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. *The Veterinary Journal*, 167: 143-149.

- Gwet, K.L. (2008) Computing inter-rater reliability and its variance in the presence of high agreement. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, 61: 29-48.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hamel, A.L.; Wasylshen, M.D.; Nayar, G.P. (1995) Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 287-291.
- Hamers, C.; Dehan, P.; Couvreur, B.; Letellier, C.; Kerkhofs, P.; Pastoret, P.P. (2001) Diversity among bovine pestiviruses. *The Veterinary Journal*, 161: 112-122.
- Hanon, J.B.; Van der Stede, Y.; Antonissen, A.; Mullender, C.; Tignon, M.; van den Berg, T.; Caij, B. (2014) Distinction between persistent and transient infection in a bovine viral diarrhoea (BVD) control programme: Appropriate interpretation of real-time RT-PCR and antigen-ELISA test results. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61:156-162.
- Hansen, T.R.; Smirnova, N.P.; Van Campen, H.; Shoemaker, M.L.; Ptitsyn, A.A.; Bielefeldt-Ohmann, H. (2010) Maternal and fetal response to fetal persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *American Journal of Reproductive Immunology*, 64: 295-306
- Hessman, B.E.; Sjeklocha, D.B.; Fulton, R.W.; Ridpath, J.F.; Johnson, B.J; McElroy, D.R. (2012) Acute bovine viral diarrhoea associated with extensive mucosal lesions, high morbidity, and mortality in a commercial feedlot. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24: 397-404.
- Hilbe, M.; Stalder, H.; Peterhans, E.; Haessig, M.; Nussbaumer, M.; Egli, C.; Schelp, C.; Zlinszky, K.; Ehrensperger, F. (2007) Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19: 28-34.
- Holland, R.E.; Bezek, D.M.; Sprecher, D.J.; Patterson, J.S.; Steficek, B.A.; Trapp, A.L. (1993) Investigation of an epizootic of bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 202: 1849-1854.
- Holler, D.L. (2012) Ruminant Abortion Diagnostics. *Veterinary Clinics Food Animal*, 28: 407-418.
- Horner, G.W.; Tham, K.M.; Orr, D.; Ralston, J.; Rowe, S.; Houghton, T. (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: 75-84.
- Houe, H. (1995) Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 11: 521-547.
- Houe, H. (1999) Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, 64: 89-107.

- Houe, H.; Lindberg, A.; Moennig, V. (2006) Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18: 427-436.
- Houe, H.; Meyling A. (1991) Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Preventive Veterinary Medicine*, 11: 9-16.
- Hyndman, L.; Vilcek, S.; Conner, J.; Nettleton, P.F. (1998) A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. *Journal of Virological Methods*, 71: 69-76.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>] consultado 15 de Julio de 2019.
- Jenckel, M.; Höper, D.; Schirmer, 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: 6983-6992.
- Jenkins, G.M.; Rambaut, A.; Pybus, O.G.; Holmes, E.C. (2002) Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution*, 54: 156-165.
- Jones, L.R.; Cigliano, M.M.; Zandomeni, R.O.; Weber, E.L. (2004) Phylogenetic analysis of bovine pestiviruses: testing the evolution of clinical symptoms. *Cladistics*, 20: 443-453.
- Jones, L.R.; Zandomeni, R.; Weber, E.L. (2001) Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Veterinary Microbiology*, 81: 367-375.
- Juliá, S.; Craig, M.I.; Jiménez, L.S.; Pinto, G.B.; Weber, E.L. (2009) First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, 90: 274-277.
- Kalyanamorthy, S.; Minh, B.Q.; Wong, T.K.F.; von Haeseler, A.; Jermin, L.S. (2017) ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14: 587-589.
- Kane, S.E.; Holler, L.D.; Braun, L.J.; Neill, J.D.; Young, D.B.; Ridpath, J.F.; Chase, C.C. (2015) Bovine viral diarrhoea virus outbreak in a beef cow herd in South Dakota. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 246: 1358-1362.
- Kass, R.E.; Raftery, A.E. (1995) Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association*, 90: 773-795.
- Kelling, C.; Steffen, D.; Cooper, V.; Higuchi, D.; Eskridge, K. (2002) Effect of infection with bovine viral diarrhoea virus alone, bovine rotavirus alone, or concurrent infection with both on enteric disease in gnotobiotic neonatal calves. *American Journal of Veterinary Research*, 63: 1179-1186.

- Kelling, C.L.; Stine, L.C.; Rump, K.K.; Parker, R.E.; Kennedy, J.E.; Stone, R.T.; Ross, G.S. (1990) Investigation of bovine viral diarrhoea virus infections in a range beef herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197: 589-593.
- Kennedy, J.A.; Mortimer, R.G.; Powers, B. (2006) Reverse transcription-polymerase chain reaction on pooled samples to detect bovine viral diarrhoea virus by using fresh ear-notch-sample supernatants. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18: 89-93.
- Kim, S.G., Dubovi, E.J. (2003) A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals*, 31: 103-106.
- Kirkbride, C.A. (1992) Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4: 374-379.
- Kirkbride, C.A.; Johnson, M.W. (1989) Serologic examination of aborted ovine and bovine fetal fluids for the diagnosis of border disease, bluetongue, bovine viral diarrhoea, and leptospiral infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1: 132-138.
- Kuijk, H.; Franken, P.; Mars, M.H.; De Weg, W.B.; Makoschey, B. (2008) Monitoring of BVDV in a vaccinated herd by testing milk for antibodies to NS3 protein. *Veterinary Record*, 163: 482-484.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Kümmerer, B.M.; Tautz, N.; Becher, P.; Thiel, H.J.; Meyers, G. (2000) The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Veterinary Microbiology*, 77: 117-128.
- Lackner, T.; Müller, A.; Pankraz, A.; Becher, P.; Thiel, H.J.; Gorbalenya, A.E.; Tautz, N. (2004) Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *Journal of Virology*, 78: 10765-10775.
- Lanyon, S.R.; Anderson, M.L.; Bergman, E.; Reichel, M.P. (2013) Validation and evaluation of a commercially available ELISA for the detection of antibodies specific to bovine viral diarrhoea virus (bovine pestivirus). *Australian Veterinary Journal*, 91: 52-56.
- Lanyon, S.R.; Hill, F.I.; Reichel, M.P.; Brownlie, J. (2014) Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Journal*, 199: 201-209.
- Larson, R.L. (2005) Management systems and control programs. En: Goyal, S.M.; Ridpath, J.F. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*. Ames, IA: Blackwell Publishing. First Edition. Chapter 14: 223-238.
- Larson, R.L.; Brodersen, B.W.; Grotelueschen D.M.; Hunsaker B.D.; Burdett, W.; Brock, K.V.; Fulton, R.W.; Goehl, D.R.; Sprowls, R.W.; Kennedy, J.A.; Loneragan, G.H.; Dargatz D.A. (2005a) Considerations for bovine viral diarrhoea (BVD) testing. *The Bovine Practitioner*, 39: 96-100.

- Larson, R.L.; Miller, R.B.; Kleiboeker, S.B.; Miller, M.A.; White, B.J. (2005b) Economic costs associated with two testing strategies for screening feeder calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226: 249-254.
- Laureyns, J.; Letellier, C.; Meganck, V.; Pardon, B.; Deprez, P.; de Kruif, A. (2011) Severe disease in neonatal calves with detection of cytopathic BVDV. *Veterinary Record*, 169: 101.
- Laureyns, J.; Ribbens, S.; Kruif, A. (2010) Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. *Veterinary Journal*, 184: 21-26.
- Lemey, P.; Rambaut, A.; Drummond, A.J.; Suchard, M.A. (2009) Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Computational Biology*, 5: e1000520.
- Lennette, E.H. (1969) General principles underlying laboratory diagnosis of viral and rickettsial infections. En: Lennette, E.H.; Schmidt, N.J. Schmidt's diagnostic procedures for viral and rickettsial infections. Fourth Edition. American Public Health Association, New York, pp1-65.
- Letellier, C.; Kerkhofs, P. (2003) Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virological Methods*, 114: 21-27.
- Lindberg, A. (2003) Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. *Veterinary Quarterly*, 25: 1-16.
- Liu, L.; Xia, H.; Wahlberg, N.; Belák, S.; Baule, C. (2009) Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*, 385: 351-357.
- Lunardi, M.; Headley, S.A.; Lisboa, J.A.; Amude, A.M.; Alfieri, A.A. (2008) Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. *Research in Veterinary Science*, 85: 599-604.
- Luzzago, C.; Ebranati, E.; Sasser, D.; Presti, A.L.; Lauzi, S.; Gabanelli, E.; Ciccozzi, M.; Zehender, G. (2012) Spatial and temporal reconstruction of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 dispersion in Italy. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 324-331.
- Makoschey, B.; Sonnemans, D.; Bielsa, J.M.; Franken, P.; Mars, M.; Santos, L.; Alvarez, M. (2007) Evaluation of the induction of NS3 specific BVDV antibodies using a commercial inactivated BVDV vaccine in immunization and challenge trials. *Vaccine*, 25: 6140-6145.
- Mari, V.; Losurdo, M.; Lucente, M.S.; Lorusso, E.; Elia, G.; Martella, V.; Patruno, G.; Buonavoglia, D.; Decaro, N. (2016) Multiplex real-time RT-PCR assay for bovine viral diarrhoea virus type 1, type 2 and HoBi-like pestivirus. *Journal of Virological Methods*, 229: 1-7.

- Marschik, T.; Obritzhauser, W.; Wagner, P.; Richter, V.; Mayerhofer, M.; Egger-Danner, C.; Käsbohrer, A.; Pinior, B. (2018) A cost-benefit analysis and the potential trade effects of the bovine viral diarrhoea eradication programme in Styria, Austria. *The Veterinary Journal*, 231: 19-29.
- Martin, D.P.; Murrell, B.; Golden, M.; Khoosal, A.; Muhire, B. (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, 1: vev003.
- McGowan, M.R.; Kirkland, P.D.; Richards, S.G.; Littlejohns, I.R. (1993) Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *The Veterinary Record*, 133: 39-43.
- McHugh, M.L. (2012) Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica*, 22: 276-282.
- Meyling, A.; Houe, H.; Jensen, A.M. (1990) Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 9: 75-93.
- Miller, M.; Pfeiffer, W.; Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees, pp. 1-8. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA.
- Minh, B.Q.; Nguyen, M.A.T., von Haeseler, A. (2013) Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 1188-1195.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Stock bovino a marzo 2019. [http://agroindustria.gob.ar/sitio/xls/Stock_Marzo_2019.xlsx?x] consultado 7 de abril de 2020.
- Moennig, V.; Becher, P. (2018) Control of bovine viral diarrhoea. *Pathogens*, 7: 29.
- Moennig, V.; Houe, H.; Lindberg, A. (2005) BVD control in Europe: current status and perspectives. *Animal Health Research Reviews*, 6: 63.
- Moore, D.P.; Campero, C.M.; Odeón, A.C.; Bardón, J.C.; Silva-Paulo, P.; Paolicchi, F.A.; Cipolla, A.L. (2003) Humoral immune response to infectious agents in aborted bovine fetuses in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 35: 143-148.
- Morrell, E.L.; Campero, C.M.; Cantón, G.J.; Odeón, A.C.; Moore, D.P.; Odriozola, E.; Paolicchi, F.; Fiorentino, M.A. (2019) Current trends in bovine abortion in Argentina. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 39: 12-19.
- Morrell, E.L.; Moore, D.P.; Odeón, C.A.; Poso, M.A.; Odriozola, E.; Cantón, G.; Paolicchi, F.; Malena, M.; Leunda, M.R.; Morsella, C.; Campero, C.M. (2008) Retrospective study of bovine neonatal mortality: cases reported from INTA Balcarce, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 40: 151-157.
- Muhire, B.M.; Varsani, A.; Martin, D.P. (2014) SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One*, 9: e108277

[\[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4178126/pdf/pone.0108277.pdf\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4178126/pdf/pone.0108277.pdf)

consultado 31 de mayo de 2019.

- Muñoz, D.P.; Lager, I.A.; Mersich, S.; Zabal, O.; Ulloa, E.; Schudel, A.A.; Weber, E.L. (1996) Foetal infections with bovine viral diarrhoea virus in Argentina. *British Veterinary Journal*, 152: 175-182.
- Muñoz-Zanzi, C.; Thurmond, M.; Hietala, S.; Johnson, W. (2006) Factors affecting sensitivity and specificity of pooled-sample testing for diagnosis of low prevalence infections. *Preventive Veterinary Medicine*, 74: 309-322.
- Muñoz-Zanzi, C.A.; Johnson, W.O.; Thurmond, M.C.; Hietala, S.K. (2000) Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12: 195-203.
- Murray, R. (1991) Lesions in aborted fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. *Archives of Virology*, 3: 217-224.
- Nagai, M.; Ito, T.; Sugita, S.; Genno, A.; Takeuchi, K.; Ozawa, T.; Sakoda, Y.; Nishimori, T.; Takamura, K.; Akashi, H. (2001) Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan. *Archives of Virology*, 146: 685-696.
- Neill, J.D. (2013) Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41: 2-7.
- Nettleton, P.F.; Entrican, G. (1995) Ruminant pestiviruses. *British Veterinary Journal*, 151: 615-642.
- Newcomer, B.W.; Chamorro, M.F.; Walz, P.H. (2017) Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary microbiology*, 206: 78-83.
- Newcomer, B.W.; Neill, J.D.; Marley, M.S.; Ridpath, J.F.; Givens, M.D. (2013) Mutations induced in the NS5B gene of bovine viral diarrhoea virus by antiviral treatment convey resistance to the compound. *Virus Research*, 174: 95-100.
- Nguyen, L.T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32: 268-274.
- Niskanen, R.; Lindberg, A. (2003) Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *The Veterinary Journal*, 165: 125-130.
- Odeón, A.C.; González Altamiranda, E.; Goizueta, M.; Verna, A.; Louge Uriarte, E.; Spetter, M.; Späth, E.; Castellano, A.; Odriozola, E.; Cantón, G.; Fernández, J.; Finelli, J.; Pereyra, S.; Leunda, M.R.; Recalt, V.; Capozzo, A.; Malacari, D. (2016) Valorización económica de la implementación de una estrategia sanitaria de control del virus de la Diarrea Viral Bovina en un establecimiento de cría. *Anales ANAV*, 169: 1-11.
- Odeón, A.C.; Risatti, G.; Kaiser, G.G.; Leunda, M.R.; Odriozola, E.; Campero, C.M.; Donis, R.O. (2003) Bovine viral diarrhoea virus genomic associations in mucosal disease,

- enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Veterinary Microbiology*, 96: 133-144.
- Odeón, A.C.; Späth, E.J.A.; Paloma, E.J.; Leunda, M.R.; Fernández Sainz, I.J.; Pérez, S.E.; Kaiser, G.G.; Draghi, M.G.; Cetrá, B.M.; Cano, A. (2001) Prevalencia de anticuerpos al virus de diarrea viral bovina, herpesvirus bovino y virus sincicial respiratorio bovino en Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 82: 216-220.
- OIE-World Organisation for Animal Health (2018) Bovine Viral Diarrhoea Chapter 3.4.7. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018 [<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>] consultado 1 de noviembre de 2018.
- Pacheco, J.M.; Lager, I. (2003) Indirect method ELISA for the detection of antibodies against bovine diarrhea virus in bovine serum. *Revista Argentina de Microbiología*, 35: 19-23.
- Packianathan, R.; Clough, W.J.; Hodge, A.; Holz, D.K.; Huang, J.; Bryant, G.L.; Colantoni, C. (2017) Prevention of fetal infection in heifers challenged with bovine viral diarrhoea virus type 1a by vaccination with a type 1c or type 1a vaccine. *New Zealand Veterinary Journal*, 65: 134-139.
- Pastorino, B.; Bessaud, M.; Grandadam, M.; Murri, S.; Tolou, H.J.; Peyrefitte, C.N. (2005) Development of a TaqMan® RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *Journal of Virological Methods*, 124: 65-71.
- Pecora, A.; Malacari, D.A.; Ridpath, J.F.; Perez Aguirreburualde, M.S.; Combessies, G.; Odeón, A.C.; Romera, S.A.; Golemba, M.D.; Wigdorovitz, A. (2014) First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Research in Veterinary Science*, 96: 204-212.
- Pecora, A.; Pérez Aguirreburualde, M.S.; Malacari, D.A.; Zabal, O.; Sala, J.M.; Konrad, J.L.; Caspe, S.G.; Bauermann, F.; Ridpath, J.; Dus Santos, M.J. (2017) Serologic evidence of HoBi-like virus circulation in Argentinean water buffalo. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29: 926-929.
- Pecora, A.; Pérez Aguirreburualde, M.S.; Ridpath, J.F.; Dus Santos, M.J. (2019) Molecular characterization of pestiviruses in fetal bovine sera originating from Argentina: evidence of circulation of HoBi-like viruses. *Frontiers in Veterinary Science*, 6: 359.
- Peddireddi, L.; Foster, K.A.; Poulsen, E.G.; An, B.; Hoang, Q.H.; O'Connell, C.; Anderson, J.W.; Thomson, D.U.; Hanzlicek, G.A.; Bai, J.; Hesse, R.A.; Oberst, R.D.; Anderson, G.A.; Leyva-Baca, I. (2018). Molecular detection and characterization of transient bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in cattle commingled with ten BVDV persistently infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30: 413-422.

- Pedreira, M.; Gómez-Villamandos, J.C.; Molina, V.; Rivalde, M.A.; Rodríguez-Sánchez, B.; Sánchez-Cordon, P.J. (2011) Quantification and determination of spread mechanisms of bovine viral diarrhoea virus in blood and tissues from colostrum-deprived calves during an experimental acute infection induced by a non-cytopathic genotype 1 strain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59: 377-384.
- Perez, S.E.; Bretschneider, G.; Leunda, M.R.; Osorio, F.A.; Flores, E.F.; Odeón, A.C. (2002) Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Veterinary Pathology*, 39: 437-444.
- Peterhans, E.; Bachofen, C.; Stalder, H.; Schweizer, M. (2010) Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary Research*, 41: 44.
- Pikaart, M.J.; Villeponteau, B. (1993) Suppression of PCR amplification by high levels of RNA. *BioTechniques*, 14: 24-25.
- Pinior, B.; Firth, C.L.; Richter, V.; Lebl, K.; Trauffer, M.; Dzieciol, M.; Hutter, S.E.; Burgstaller, J.; Obritzhauser, W.; Winter, P.; Käsbohrer, A. (2017) A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Preventive Veterinary Medicine*, 137: 77-92.
- Pinto, G.B.; Hawkes, P.; Zabal, O. (1993) Viral antibodies in bovine fetuses in Argentina. *Research in Veterinary Science*, 55: 385-388.
- Pizarro-Lucero, J.; Celedón, M.O.; Aguilera, M.; de Calisto, A. (2006) Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Veterinary microbiology*, 115: 208-217.
- Presi, P.; Struchen, R.; Knight-Jones, T.; Scholl, S.; Heim, D. (2011) Bovine viral diarrhoea (BVD) eradication in Switzerland-experiences of the first two years. *Preventive Veterinary Medicine*, 99: 112-121.
- Pybus, O.G.; Rambaut, A. (2009) Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nature Reviews Genetics*, 10: 540-550.
- Qi, F.; Ridpath, J.F.; Lewis, T.; Bolin, S.R.; Berry, E.S. (1992) Analysis of the bovine viral diarrhoea virus genome for possible cellular insertions. *Virology*, 189: 285-292.
- Rambaut, A.; Lam, T.T.; Max Carvalho, L.; Pybus, O.G. (2016) Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evolution*, 2: vew007.
- Richter, V.; Kattwinkel, E.; Firth, C.L.; Marschik, T.; Dangelmaier, M.; Trauffer, M.; Obritzhauser, W.; Baumgartner, W.; Käsbohrer, A.; Pinior, B. (2019) Mapping the global prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection and its associated mitigation programme. *The Veterinary Record*, 184: 711.

- Richter, V.; Lebl, K.; Baumgartner, W.; Obrithauser, W.; Käsbohrer, A.; Pinior, B. (2017) A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Veterinary Journal*, 220: 80-87.
- Ridpath, J.F. (2003) BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, 31: 127-131.
- Ridpath, J.F. (2010) Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 26: 105-121.
- Ridpath, J.F.; Bolin, S.R.; Dubovi, E.J. (1994) Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, 205: 66-74.
- Ridpath, J.F.; Chiang, Y.W.; Waldbillig, J.; Neill, J.D. (2009) Stability of bovine viral diarrhoea virus antigen in ear punch samples collected from bovine fetuses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21: 346-349.
- Ridpath, J.F.; Fulton, R.W.; Kirkland, P.D.; Neill, J.D. (2010) Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22: 184-191.
- Ridpath, J.F.; Neill, J.D. (2015) Pestiviruses: old enemies and new challenges. *Animal Health Research Reviews*, 16: 1-3.
- Ridpath, J.F.; Neill, J.D.; Chiang, Y.W.; Waldbillig, J. (2014) Stability of bovine viral diarrhoea virus 1 nucleic acid in fetal bovine samples stored under different conditions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26: 6-9.
- Ridpath, J.F.; Neill, J.D.; Frey, M.; Landgraf, J.G. (2000) Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Veterinary Microbiology*, 77: 145-155.
- Rodríguez, A.; Weber, N.; Cantón, G.; Moore, D.; Moreira, A.; Morrell, E.; Odeón, A.; Odriozola, E.; Campero, C. (2012) Causes of Bovine Abortion in Argentina. *Journal of Comparative Pathology*, 1: 74.
- Rossmannith, W.; Vilcek, S.; Wenzl, H.; Rossmannith, E.; Loitsch, A.; Durkovic, B.; Strojny, L.; Paton, D.J. (2001) Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhoea eradication program. *Veterinary Microbiology*, 81: 207-218.
- Rweyemamu, M.M.; Fernandez, A.A.; Espinosa, A.M.; Schudel, A.A.; Lager, I.A.; Mueller, S.B. (1990) Incidence, epidemiology and control of bovine virus diarrhoea virus in South America. *Revue Scientifique et Technique*, 9: 207-221.
- Saitou, N.; Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.

- Salemi, M. (2009) The problem of substitution saturation. En: Lemey, P.; Salemi, M.; Vandamme, A-M. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge University Press. 2nd edition. Chapter 4: 137-140.
- Saliki, J.T.; Dubovi, E.J. (2004) Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Veterinary Clinics Animal Practice*, 20: 69-83.
- Saliki, J.T.; Fulton, R.W.; Hull, S.R.; Dubovi, E.J. (1997) Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 803-807.
- Sanabria, R.; Alvarado Pinedo, M.F.; Travería, G.; Di Paolo, A.; Romero, J. (2007) Estudio de respuesta serológica contra la *Neospora caninum* y virus de la DVB en fetos abortados de rodeos de cría de la provincia de Buenos Aires. *Revista Medicina Veterinaria*, 88: 93-96.
- Sandvik, T. (2005) Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Preventive Veterinary Medicine*, 72: 3-16.
- Sandvik, T.; Greiser-Wilke, I.; Graham, D. (2001) Genome, diagnosis and diagnostic tools. En: EU Thematic Network on Control of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV): Position Paper. pp 1-23.
[\[https://www.afbini.gov.uk/sites/afbini.gov.uk/files/publications/%5Bcurrent-domain%3Amachine-name%5D/CHS%20thematic%20network%20control%20of%20BVD.pdf\]](https://www.afbini.gov.uk/sites/afbini.gov.uk/files/publications/%5Bcurrent-domain%3Amachine-name%5D/CHS%20thematic%20network%20control%20of%20BVD.pdf) consultado 14 de octubre de 2020.
- Sargeant, J.M.; Martin, S.W. (1998) The dependence of kappa on attribute prevalence when assessing the repeatability of questionnaire data. *Preventive Veterinary Medicine*, 34: 115-123.
- Sarrazin, S.; Veldhuis, A.; Méroc, E.; Vangeel, I.; Laureyns, J.; Dewulf, J.; Caij, A.; Piepers, S.; Hooyberghs, J.; Ribbens, S.; Van Der Stede, Y. (2013) Serological and virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seropositive in Belgian cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 108: 28-37.
- Sayers, R.G.; Sayers, G.P.; Graham, D.A.; Arkins, S. (2015) Impact of three inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines on bulk milk p80 (NS3) ELISA test results in dairy herds. *The Veterinary Journal*, 205: 56-61.
- Scharnböck, B.; Roch, F.F.; Richter, V.; Funke, C.; Firth, C.; Orbitzhauser, W.; Baumgartner, W.; Käsbohrer, A.; Pinior, B. (2018) A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalence in the global cattle population. *Scientific Reports*, 8: 1-15.
- Schefers, J.; Munoz-Zanzi, C.; Collins, J.E.; Goyal, S.M.; Ames, T.R. (2008) Serological evaluation of precolostral serum samples to detect Bovine viral diarrhoea virus infections in large commercial dairy herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20: 625-628.

- Schweizer, M.; Peterhans, E. (2014) Pestiviruses. *Annual Review of Animal Biosciences* 2: 141-163.
- Simmonds, P.; Becher, P.; Bukh, J.; Gould, E.A.; Meyers, G.; Monath, T.; Stapleton, J.T. (2017) ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, 98: 2-3.
- Smith, R.L.; Sanderson, M.W.; Jones, R.; N'Guessan, Y.; Renter, D.; Larson, R.; White, B.J. (2014) Economic risk analysis model for bovine viral diarrhea virus biosecurity in cow-calf herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 113: 492-503.
- Smith, R.L.; Sanderson, M.W.; Walz, P.H.; Givens, M.D. (2008) Sensitivity of polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled serum samples and use of pooled polymerase chain reaction to determine prevalence of bovine viral diarrhea virus in auction market cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20: 75-78.
- Song, M.K.; Chang, J.; Hong, Y.; Hong, S.; Kim, S.W. (2009) Direct multiplex reverse transcription-nested PCR detection of influenza viruses without RNA purification. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 1470-1474.
- Späth, E.J.A.; Becker, B.F. (2012) Análisis epidemiológico de 8 años de diagnósticos de enfermedades de los bovinos. *INTA Boletín Técnico* N° 160 (ISSN 0522-0548).
- Stack, J.C.; Welch, J.D.; Ferrari, M.J.; Shapiro, B.U.; Grenfell, B.T. (2010) Protocols for sampling viral sequences to study epidemic dynamics. *Journal of the Royal Society Interface*, 7: 1119-1127.
- Stevens, E.T.; Thomson, D.U.; Wileman, B.W.; O'Dell, S.; Chase, C.C. (2011) The survival of bovine viral diarrhea virus on materials associated with livestock production. *The Bovine Practitioner*, 45: 118-123.
- Strimmer, K.; Von Haeseler, A. (1997) Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 6815-6819.
- Suchard, M.A.; Lemey, P.; Baele, G.; Ayres, D.L.; Drummond, A.J.; Rambaut, A. (2018) Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4: vey016.
- Tarabla, H.; Signorini, M. (2013) Elección de la prueba. En: Tarabla, H.; Signorini, M. *Epidemiología Diagnóstica*. Ediciones UNL, Santa Fé. Primera edición. Capítulo 14: 161-163.
- Tautz, N.; Tews, B.A.; Meyers, G. (2015) The molecular biology of pestiviruses. En: *Advances in virus research* (Vol. 93, pp. 47-160). Academic Press.
- Taylor, L.; Janzen, E.; Ellis, J.; Van den Hurk, J.; Ward, P. (1997) Performance, survival, necropsy, and virological findings from calves persistently infected with the bovine viral diarrhea virus originating from a single Saskatchewan beef herd. *Canadian Veterinary Journal*, 38: 29-37.

- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Toplak, I.; Sandvik, T.; Barlič-Maganja, D.; Grom, J.; Paton, D.J. (2004) Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Veterinary Microbiology*, 99: 175-185.
- Tramuta, C.; Lacerenza, D.; Zoppi, S.; Goria, M.; Dondo, A., Ferroglio, E.; Nebbia, P.; Rosati, S. (2011) Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23: 657-664.
- Van Campen, H. (2010) Epidemiology and control of BVD in the US. *Veterinary Microbiology*, 142: 94-98.
- Vilcek, S.; Greiser-Wilke, I.; Nettleton, P.; Paton, D.J. (2000) Cellular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates. *Veterinary Microbiology*, 77: 129-136.
- Vilcek, S.; Herring, A.J.; 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: 309-323.
- Vilcek, S.; Paton, D.J.; Durkovic, B.; Strojny, L.; Ibata, G.; Moussa, A.; Loitsch, A.; Rossmanith, W.; Vega, S.; Scicluna, M.T.; Paifi, V. (2001) Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archive of Virology*, 146: 99-115.
- Volz, E.M.; Koelle, K.; Bedford, T. (2013) Viral phylodynamics. *PLoS Computational Biology*, 9: e1002947.
- Walz, P.H.; Bell, T.G.; Wells, J.L.; Grooms, D.L.; Kaiser, L.; Maes, R.K.; Baker, J.C. (2001) Relationship between degree of viremia and disease manifestations in calves with experimentally induced bovine viral diarrhoea virus infection. *American Journal of Veterinary Research*, 62: 1095-1103.
- Walz, P.H.; Grooms, D.L.; Passler, T.; Ridpath, J.F.; Tremblay, R.; Step, D.L.; Callan, R.J.; Givens, M.D. (2010) Control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24: 476-786.
- Wambura, P. (2006) Use of virus suspensions without RNA extraction as RT-PCR templates for detection of Newcastle disease virus. *African Journal of Biotechnology*, 5: 1722-1724.
- Wang, L.; Wu, X.; Wang, C.; Song, C.; Bao, J.; Du, J. (2020) Origin and transmission of bovine viral diarrhoea virus type 1 in China revealed by phylodynamic analysis. *Research in Veterinary Science*, 128: 162-169.

- Weber, M.N.; Silveira, S.; Machado, G.; Groff, F.H.S.; Mósen, A.C.S.; Budaszewski, R.F.; Dupont, D.M.; Corbellini, L.G.; Canal, C.W. (2014) High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Research*, 191: 117-124.
- Weinstock, D.; Bhudevi, B.; Castro, A.E. (2001) Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 343-346.
- White, B.; Hesse, R.A.; Renter, D.G.; Nickel, J.; Larson, R.; Oberst, R.; Anderson, J.; Peddireddi, L.; Munoz, R.; El-Attrache, J.; Boss, C. (2010) Utilization of VETMAXTM-GOLD BVDV detection kit for the detection and potential differentiation of persistently infected and transiently infected cattle. En: 1st Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD2012), Lelystad, The Netherlands. Central Veterinary Institute, Wageningen, The Netherlands, pp. O-2-03.
- Wilda, M.; Lavoria, M.Á.; Giráldez, A.; Franco-Mahecha, O.L.; Mansilla, F.; Érguiz, M.; Iglesias, M.E.; Capozzo, A.V. (2012) Development and preliminary validation of an antibody filtration-assisted single-dilution chemiluminometric immunoassay for potency testing of *Piscirickettsia salmonis* vaccines. *Biologicals*, 40: 415-20.
- Wittum, T.E.; Grotelueschen, D.M.; Brock, K.V.; Kvasnicka, W.G.; Floyd, J.G.; Kelling, C.L.; Odde, K.G. (2001) Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 49: 83-94.
- Xia, X. (2018) DAMBE7: New and Improved Tools for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1550-1552.
- Xia, X.; Xie, Z.; Salemi, M.; Chen, L.; Wang, Y. (2003). An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 1-7.
- Yan, L.; Zhang, S.; Pace, L.; Wilson, F.; Wan, H.; Zhang, M. (2011) Combination of reverse transcription real-time polymerase chain reaction and antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23: 16-25.
- Yeşilbağ, K.; Alpay, G.; Becher, P. (2017) Variability and global distribution of subtypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses*, 9: 128.
- Zhang, S.Q.; Tan, B.; Li, P.; Wang, F.X.; Guo, L.; Yang, Y.; Sun, N.; Zhu, H.W.; Wen, Y.J.; Cheng, S.P. (2014) Comparison of conventional RT-PCR, reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, and SYBR green I-based real-time RT-PCR in the rapid detection of bovine viral diarrhoea virus nucleotide in contaminated commercial bovine sera batches. *Journal of Virological Methods*, 207: 204-209.
- 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: 145-149.

ANEXO

Tabla A1: Secuencias de la región 5'UTR y NS5B de cepas del VDVB obtenidas de muestras utilizadas para la presente tesis

Cepa	Muestra	Región génica	Núm. Acc. GenBank	Referencia
98-096	Feto	5'UTR	MK684367	Tesis
98-204	Feto	5'UTR	JX848359	Pecora y col., 2014
98-530	Feto	5'UTR	MK684368	Tesis
99-535	Feto	5'UTR	MK684369	Tesis
04-558	Feto	5'UTR	MK684370	Tesis
04-567	Feto	5'UTR	MK684371	Tesis
04-619	Feto	5'UTR	MK684372	Tesis
04-725	Feto	5'UTR	MK684373	Tesis
04-749	Feto	5'UTR	MK684374	Tesis
05-1151	Feto	5'UTR	MK684375	Tesis
07-509	Feto	5'UTR	MK684376	Tesis
08-538	Feto	5'UTR	MK684377	Tesis
08-546	Feto	5'UTR	MK684378	Tesis
08-724	Feto	5'UTR	JX679693	Pecora y col., 2014
09-617	Feto	5'UTR	MK684379	Tesis
09-688	Feto	5'UTR	MK684380	Tesis
10-405	Feto	5'UTR	MK684381	Tesis
10-430	Feto	5'UTR	MK684382	Tesis
10-636 brain/fc	Feto	5'UTR	MH294527	Tesis
10-636 brain/fc	Feto	NS5B	MH294528	Tesis
10-636 spleen/lung	Feto	NS5B	MH294529	Tesis
10-698	Feto	5'UTR	MK684383	Tesis
11-652	Feto	5'UTR	MK684384	Tesis
12-141	Feto	5'UTR	MK684385	Tesis
13-434	Feto	NS5B	MK684395	Tesis
13-464	Feto	5'UTR	MK684386	Tesis
14-287	Feto	5'UTR	MK684387	Tesis
15-512	Feto	5'UTR	MK684388	Tesis
15-512	Feto	NS5B	MN248510	Tesis
15-580	Feto	5'UTR	MK684389	Tesis
16-302	Feto	5'UTR	MK684390	Tesis
16-478	Feto	5'UTR	MK684391	Tesis
17-361	Feto	5'UTR	MK684392	Tesis
18-417	Feto	5'UTR	MK684393	Tesis

Tabla A1 (continuación): Secuencias de la región 5'UTR y NS5B de cepas del VDVB obtenidas de muestras utilizadas para la presente tesis

Cepa	Muestra	Región génica	Núm. Acc. GenBank	Referencia
18-437	Feto	5'UTR	MK684394	Tesis
09-366	Suero	5'UTR	JQ646074	González Altamiranda y col., 2012
16-154	Suero	5'UTR	MN248499	Tesis
16-230	Suero	5'UTR	MN248500	Tesis
16-677	Suero	5'UTR	MN248501	Tesis
17-079	Suero	5'UTR	MN248504	Tesis
17-178	Suero	5'UTR	MN248505	Tesis
18-595	Suero	5'UTR	MN248506	Tesis
13223	Suero	5'UTR	JX848365	Pecora y col., 2014
413PI	Suero	5'UTR	MN248502	Tesis
413PI	Suero	NS5B	MN248508	Tesis
440PI	Suero	NS5B	MN248509	Tesis
PI San Gabriel	Suero	5'UTR	MN248503	Tesis
PI San Gabriel	Suero	NS5B	MN248511	Tesis

Tabla A2: Secuencias de la región 5'UTR del VDVB utilizadas en el análisis de identidad de a pares

Cepa	Núm. Acc. GenBank	Subtipo	Cepa	Núm. Acc. GenBank	Subtipo
68.88	AF244962	1a	17	MF120559	1b
47	MF120568	1a	18	MF120560	1b
66	MF120576	1a	26	MF120561	1b
79	MF120583	1a	31	MF120562	1b
176	MF120591	1a	35	MF120563	1b
184	MF120593	1a	38	MF120564	1b
14109	JX848363	1a	42	MF120565	1b
71267	JX848354	1a	45	MF120566	1b
12a	FJ615536	1a	46	MF120567	1b
13-736	MN248494	1a	50	MF120569	1b
1R	AF244955	1a	53	MF120570	1b
1R93	AF244956	1a	54	MF120571	1b
25H	AF244965	1a	56	MF120572	1b
2a	FJ615532	1a	57	MF120573	1b
36P	AY443028	1a	64	MF120574	1b
3a	FJ615533	1a	65	MF120575	1b
4H	AF244964	1a	67	MF120577	1b
5a	FJ615534	1a	70	MF120578	1b
6.89	AY443030	1a	72	MF120579	1b
66.3	AF244967	1a	74	MF120580	1b
66.5	AF244961	1a	77	MF120581	1b
8b	FJ615535	1a	78	MF120582	1b
akt1	AY443029	1a	83	MF120584	1b
buffalo17	FM165313	1a	118	MF120588	1b
buffalo24	FM165314	1a	146	MF120589	1b
buffalo2	FM165315	1a	150	MF120590	1b
i318	AF244958	1a	181	MF120592	1b
ncp2	AY443027	1a	214	MF120594	1b
05.26	AM709623	1a	25366	JX848358	1b
720	AF417988	1a	59473	JX848355	1b
88625	JX679695	1a	63588	JX848356	1b
4	MF120552	1b	73611	JX848352	1b
7	MF120554	1b	78256	JX848357	1b
8	MF120555	1b	82018	JX848361	1b
11	MF120556	1b	83532	JX848353	1b
13	MF120557	1b	86261	JX848360	1b
14	MF120558	1b	88625	JX679695	1b

Tabla A2 (continuación): Secuencias de la región 5'UTR del VDVB utilizadas en el análisis de identidad de a pares

Cepa	Núm. Acc. GenBank	Subtipo
90611	JX679694	1b
95409	JX848362	1b
00-693	MK558701	1b
08-105	JX679697	1b
08-146	JX679698	1b
08-707	JX679687	1b
09-055	JX679689	1b
09-134	JX679690	1b
09-165	JX679691	1b
09-295	JX679692	1b
09-342	JQ646075	1b
09-464	JQ646073	1b
09-792	JX679688	1b
3P	AF244968	1b
66.2	AY443031	1b
66.6	AF244966	1b
99-134	MN248479	1b
buffalo2cloneA	FM165310	1b
FBS-A	MH992638	1b
FBS-B	MH992639	1b
i66.1	AF244953	1b
i76865	AF244969	1b
98-922	MN248478	2b
i33283	AF417996	2b
34B	AF244952	2b
i354	AF244959	2b
ncp7	AY443026	2b
14-663	MK558702	2b
13-102	MN248488	2b
101	MF120585	2b

Tabla A3: Estimaciones de la edad del ancestro común más reciente y tasa de sustitución del conjunto de datos de 105 secuencias del fragmento 5'UTR del VDVB-1b

	tMRCA ^a		Tasa (sustituciones/sitio/año)	
	Año	HPD95% ^b	Mediana	HPD95% ^b
VDVB-1b (105 secuencias)	1958	1907 - 1980	4,71 x 10 ⁻⁴	2,01 x 10 ⁻⁴ - 7,94 x 10 ⁻⁴

^aTiempo del ancestro común más reciente; ^bDistribución de probabilidad posterior 95%

Tabla A4: Estimaciones del *log marginal likelihood* de las diferentes combinaciones de modelos con los métodos *Path sampling* y *Stepping Stone sampling* del conjunto de datos de 105 secuencias del fragmento 5'UTR del VDVB-1b. El modelo seleccionado se muestra en formato negrita

	Modelo sustitución	Modelo reloj molecular	Modelo demográfico	<i>Path sampling</i>	<i>Stepping stone sampling</i>
VDVB-1b (105 secuencias)	K2P+G4	Estricto	Constante	-2484,56	-2484,56
		Estricto	Exponencial	-2443,84	-2443,84
		Estricto	<i>Bayesian Skyline</i>	-2439,82	-2439,82
		Estricto	<i>GMRF Bayesian Skyride</i>	-2441,74	-2441,74
		Relajado	Constante	-2477,81	-2477,81
		Relajado	Exponencial	-2438,24	-2438,24
		Relajado	<i>Bayesian Skyline</i>	-2436,94	-2436,94
		Relajado	<i>GMRF Bayesian Skyride</i>	-2441,81	-2441,81

Tabla A5: Secuencias de la región 5'UTR del VDVB utilizadas en el análisis de filodinamia

Cepa	Núm. Acc. GenBank	Año	Subtipo	Provincia
68.88	AF244962	1988	1a	Sin dato
08-346	JX679699	2008	1a	Bs. As.
71267	JX848354	2006	1a	Córdoba
buffalo2	FM165315	2005	1a	Corrientes
buffalo17	FM165313	2005	1a	Corrientes
buffalo24	FM165314	2005	1a	Corrientes
176	MF120591	2016	1a	Bs. As.
79	MF120583	2014	1a	Bs. As.
66	MF120576	2014	1a	Bs. As.
47	MF120568	2014	1a	Bs. As.
i318	AF244958	1994	1a	Sin dato
1R	AF244955	1990	1a	Bs. As.
66.3	AF244967	1989	1a	Sin dato
ncp2	AY443027	1992	1a	Bs. As.
1R93	AF244956	1993	1a	Bs. As.
4H	AF244964	1997	1a	Bs. As.
25H	AF244965	1997	1a	Bs. As.
6.89	AY443030	1989	1a	Sin dato
36P	AY443028	1991	1a	Bs. As.
66.5	AF244961	1988	1a	Sin dato
13-736	MN248494	2013	1a	Bs. As.
13-438	MN248492	2013	1a	Bs. As.
13-041	MN248486	2013	1a	Bs. As.
13-076	MN248487	2013	1a	Bs. As.
13-194	MN248489	2013	1a	Bs. As.
14-438	MN248496	2014	1a	Bs. As.
3a	FJ615533	2004	1a	Santa Cruz
2a	FJ615532	2004	1a	Santa Cruz
5a	FJ615534	2004	1a	Santa Cruz
8b	FJ615535	2004	1a	Santa Cruz
12a	FJ615536	2004	1a	Santa Cruz
04-558	MK684370	2004	1a	Bs. As.
08-538	MK684377	2008	1a	Bs. As.
08-546	MK684378	2008	1a	Bs. As.
11-652	MK684384	2011	1a	Bs. As.
13-464	MK684386	2013	1a	Bs. As.
18-417	MK684393	2018	1a	Bs. As.

Tabla A5 (continuación): Secuencias de la región 5'UTR del VDVB utilizadas en el análisis de filodinamia

Cepa	Núm. Acc. GenBank	Año	Subtipo	Provincia
18-437	MK684394	2018	1a	Bs. As.
17-079	MN248504	2017	1a	Bs. As.
13-558	MK558700	2013	1a	Bs. As.
03-417	MN248480	2003	1a	Bs. As.
18-470	MN248506	2018	1a	Bs. As.
184	MF120593	2016	1a	Bs. As.
akt1	AY443029	1999	1a	Sin dato
14109	JX848363	2009	1a	Bs. As.
16-677	MN248501	2016	1b	Bs. As.
66.6	AF244966	1984	1b	Sin dato
98-096	MK684367	1998	1b	Bs. As.
98-204	JX848359	1998	1b	Bs. As.
99-535	MK684369	1999	1b	Bs. As.
04-567	MK684371	2004	1b	Bs. As.
04-619	MK684372	2004	1b	Bs. As.
04-749	MK684374	2004	1b	Bs. As.
05-1151	MK684375	2005	1b	Bs. As.
07-509	MK684376	2007	1b	Bs. As.
08-724	JX679693	2008	1b	Bs. As.
09-617	MK684379	2009	1b	Bs. As.
09-688	MK684380	2009	1b	Bs. As.
10-405	MK684381	2010	1b	Bs. As.
10-430	MK684382	2010	1b	Bs. As.
10-698	MK684383	2010	1b	Bs. As.
12-141	MK684385	2012	1b	Bs. As.
14-287	MK684387	2014	1b	Bs. As.
15-512	MK684388	2015	1b	Bs. As.
15-580	MK684389	2015	1b	Bs. As.
16-302	MK684390	2016	1b	Bs. As.
16-478	MK684391	2016	1b	Bs. As.
17-361	MK684392	2017	1b	Bs. As.
PISGab.	MN248503	2018	1b	Bs. As.
16-154	MN248499	2016	1b	Bs. As.
16-230	MN248500	2016	1b	Santa Fe
17-178	MN248505	2017	1b	Bs. As.
19-063	MN248507	2019	1b	Bs. As.
413PI	MN248502	2016	1b	Bs. As.

Tabla A5 (continuación): Secuencias de la región 5'UTR del VDVB utilizadas en el análisis de filodinamia

Cepa	Núm. Acc. GenBank	Año	Subtipo	Provincia
09-366	JQ646074	2009	1b	Bs. As.
00-693	MK558701	2000	1b	Bs. As.
04-089	MN248481	2004	1b	Bs. As.
10-049	MN248482	2010	1b	Bs. As.
10-647	MN248483	2010	1b	Bs. As.
10-676	MN248484	2010	1b	Bs. As.
11-699	MN248485	2011	1b	Santa Fe
13-252	MN248490	2013	1b	Bs. As.
13-413	MN248491	2013	1b	Bs. As.
13-583	MN248493	2013	1b	Bs. As.
14-060	MN248495	2014	1b	Bs. As.
15-317	MN248497	2015	1b	Bs. As.
16-019	MN248498	2016	1b	Bs. As.
95-393	MN248477	1995	1b	Bs. As.
99-134	MN248479	1999	1b	Bs. As.
08-105	JX679697	2008	1b	Bs. As.
08-146	JX679698	2008	1b	Bs. As.
08-707	JX679687	2008	1b	Bs. As.
09-055	JX679689	2009	1b	Bs. As.
09-134	JX679690	2009	1b	Bs. As.
09-165	JX679691	2009	1b	Bs. As.
09-295	JX679692	2009	1b	Bs. As.
09-342	JQ646075	2009	1b	Bs. As.
09-464	JQ646073	2009	1b	Bs. As.
09-792	JX679688	2009	1b	Bs. As.
7	MF120554	2014	1b	Bs. As.
38	MF120564	2014	1b	Bs. As.
45	MF120566	2014	1b	Bs. As.
146	MF120589	2015	1b	Bs. As.
150	MF120590	2015	1b	Bs. As.
181	MF120592	2016	1b	Bs. As.
214	MF120594	2016	1b	Bs. As.
3P	AF244968	1990	1b	Bs. As.
66.2	AY443031	1989	1b	Sin dato
i66.1	AF244953	1989	1b	Sin dato
i76865	AF244969	1999	1b	Sin dato
S21	AF244963	1999	1b	Sin dato

Tabla A5 (continuación): Secuencias de la región 5'UTR del VDVB utilizadas en el análisis de filodinamia

Cepa	Núm. Acc. GenBank	Año	Subtipo	Provincia
78256	JX848357	2007	1b	Bs. As.
83532	JX848353	2007	1b	Bs. As.
90611	JX679694	2008	1b	Bs. As.
25366	JX848358	2003	1b	Bs. As.
13223	JX848365	2010	1b	Bs. As.
59473	JX848355	2006	1b	Bs. As.
63588	JX848356	2006	1b	Bs. As.
73611	JX848352	2007	1b	Bs. As.
82018	JX848361	2007	1b	Bs. As.
86261	JX848360	2008	1b	Bs. As.
95409	JX848362	2008	1b	Bs. As.
88625	JX679695	2008	1b	Bs. As.
buffalo2	FM165310	2005	1b	Corrientes
95-008	AY273777	1995	2a	Bs. As.
106	MF120586	2014	2a	Bs. As.
76-08	JX848364	2008	2a	Bs. As.
98-922	MN248478	1998	2b	Bs. As.
13-102	MN248488	2013	2b	Bs. As.
98-124	MH074881	1998	2b	Bs. As.
98-530	MK684368	1998	2b	Bs. As.
04-725	MK684373	2004	2b	Bs. As.
10-636	MH294527	2010	2b	Bs. As.
14-663	MK558702	2014	2b	Bs. As.
101	MF120585	2014	2b	Bs. As.
34B	AF244952	1991	2b	Sin dato
i354	AF244959	1995	2d	Sin dato
ncp7	AY443026	1993	2b	Bs. As.
86275	JX679696	2008	2b	Santa Fe
i628	AF417985	2001	2a	Sin dato
i61380	AF417986	2001	2a	Sin dato
i4083	AF417995	2001	2a	Sin dato
buffalo17	FM165309	2005	2b	Corrientes
i33283	AF417996	2001	2b	Sin dato

Tabla A6: Detección del VDVB por RT-nPCR en sueros bovinos de rodeos localizado en tres provincias de Argentina

Rodeo	Provincia	Sistema productivo	Propósito de muestreo	Sueros muestreados	Sueros positivos	Signología clínica
1	Bs. As.	Carne	Caso	1	1	Si
2	Bs. As.	Carne	Caso	2	1	Si
3	Bs. As.	Carne	Saneamiento	101	3	No
4	Bs. As.	Carne	Caso	4	3	Si
5	Santa Fe	Carne	Caso	3	2	Si
6	Bs. As.	Carne	Caso	2	1	No especificado
7	Bs. As.	Carne	Caso	1	1	No especificado
8	Bs. As.	Carne	Saneamiento	40	2	No
9	Bs. As.	Carne	Saneamiento	457	11	Si
10	Bs. As.	Tambo	Caso	7	3	No
11	Bs. As.	Carne	Caso	1	1	Si
12	Bs. As.	Carne	Saneamiento	155	0	No
13	Bs. As.	Carne	Saneamiento	113	0	No
14	Bs. As.	Carne	Saneamiento	14	0	No
15	Bs. As.	Carne	Caso	5	0	No especificado
16	Bs. As.	Carne	Saneamiento	15	0	No
17	Bs. As.	Carne	Caso	1	0	No
18	Bs. As.	Carne	Caso	1	0	No
19	Bs. As.	Carne	Saneamiento	13	0	No especificado
20	Bs. As.	Carne	Saneamiento	50	0	No especificado
21	Bs. As.	Carne	Saneamiento	8	0	No especificado
22	Bs. As.	Carne	Caso	2	0	No especificado
23	Bs. As.	Carne	Caso	5	0	No especificado
24	Bs. As.	Carne	Saneamiento	140	0	No especificado
25	Bs. As.	Carne	Caso	1	0	No especificado
26	Bs. As.	Carne	Caso	1	0	No especificado
27	Bs. As.	Carne	Caso	1	0	No especificado
28	Bs. As.	Tambo	Saneamiento	20	0	No especificado
29	Bs. As.	Tambo	Saneamiento	61	0	No especificado
30	Córdoba	Tambo	Saneamiento	153	0	No especificado
31	Bs. As.	Carne	Caso	10	0	No
32	Bs. As.	Carne	Control	43	0	No especificado
33	Bs. As.	Carne	Saneamiento	21	0	No
34	Bs. As.	Carne	Saneamiento	52	0	Si
35	Bs. As.	Carne	Saneamiento	529	0	Si

Tabla A6 (continuación): Detección del VDVB por RT-nPCR en sueros bovinos de rodeos localizado en tres provincias de Argentina

Rodeo	Provincia	Sistema productivo	Propósito de muestreo	Sueros muestreados	Sueros positivos	Signología clínica
36	Bs. As.	Carne	Saneamiento	181	0	No especificado
37	Santa Fe	Carne	Saneamiento	90	0	Si
38	Bs. As.	Carne	Saneamiento	180	0	No especificado
39	Bs. As.	Carne	Caso	2	0	No especificado
40	Bs. As.	Carne	Saneamiento	60	0	Si
41	Bs. As.	Carne	Caso	1	0	No especificado
42	Bs. As.	Carne	Saneamiento	90	0	No especificado
43	Bs. As.	Carne	Saneamiento	60	0	Si
44	Bs. As.	Carne	Saneamiento	12	0	Si
45	Bs. As.	Carne	Saneamiento	50	0	Si
46	Bs. As.	Carne	Saneamiento	14	0	No especificado
47	Bs. As.	Carne	Caso	15	0	No especificado
48	Bs. As.	Carne	Caso	5	0	No especificado
49	Bs. As.	Carne	Saneamiento	13	0	No especificado
50	Bs. As.	Carne	Caso	1	0	No especificado
51	Bs. As.	Carne	Caso	3	0	No especificado
52	Bs. As.	Carne	Caso	2	0	No especificado
53	Bs. As.	Carne	Caso	1	0	No especificado
54	Bs. As.	Carne	Caso	1	0	No especificado
55	Bs. As.	Carne	Saneamiento	50	0	No especificado

Tabla A7: Títulos de anticuerpos neutralizantes en muestras de fluidos de cavidad (n = 51)

Caso	Edad gestacional	Media geométrica títulos de AcN ^a			AcN predominante ^b	Detección del VDVB	Subtipo detectado	Lesiones microscópicas	Malformaciones congénitas
		VDVB-1a	VDVB-1b	VDVB-2b					
04-558	3° trimestre	-	-	3	VDVB-2b	AV; RT-qPCR	1a	si	no
04-725	3° trimestre	2	3	3,29	VDVB-2b	AV; RT-nPCR; RT-qPCR	2b	si	no
05-1151	3° trimestre	3	3,3	3,3	ambiguo	AV; RT-qPCR	1b	si	no
06-736	3° trimestre	2	2	5	VDVB-2b	-	-	no	no
06-829	3° trimestre	5	5	3	VDVB-1a VDVB-1b	-	-	si	no
07-509	3° trimestre	5	4,64	3,63	VDVB-1a VDVB-1b	AV; ELISAag; RT-nPCR	1b	sin dato	sin dato
07-688	sin dato	4	4	4	ambiguo	-	-	si	no
08-278	2° trimestre	4,64	4,64	9	VDVB-2b	-	-	si	no
08-356	3° trimestre	4,9	3,78	3,3	VDVB-1a	-	-	si	no
08-378	3° trimestre	6	4,9	3,63	VDVB-1a	-	-	si	no
08-430	3° trimestre	3,3	4,64	4,31	VDVB-1b VDVB-2b	-	-	si	no
08-538	3° trimestre	5	4,31	3,63	VDVB-1a	AV; RT-nPCR; RT-qPCR	1a	sin dato	sin dato
08-581	sin dato	6	5,31	5,31	ambiguo	-	-	si	no

^a Media geométrica obtenida de la lectura de tres operarios y expresada en log₂; se consideraron positivas las muestras con títulos de anticuerpos neutralizantes iguales o superiores a 2 (dilución 1:4).

^b Interpretación según Bauermann y col. (2017) y Pecora y col. (2017).

Tabla A7 (continuación): Títulos de anticuerpos neutralizantes en muestras de fluidos de cavidad (n = 51)

Caso	Edad gestacional	Media geométrica títulos de AcN ^a			AcN predominante ^b	Detección del VDVB	Subtipo detectado	Lesiones microscópicas	Malformaciones congénitas
		VDVB-1a	VDVB-1b	VDVB-2b					
09-263	3° trimestre	5,94	7,87	5	VDVB-1b	-	-	si	no
09-267	sin dato	6,32	9	5	VDVB-1b	-	-	si	si
10-405	3° trimestre	2	3,63	4	VDVB-1b VDVB-2b	RT-nPCR; RT-qPCR	1b	si	no
10-636	3° trimestre	-	2	2	VDVB-1b VDVB-2b	AV; ELISAag; RT-nPCR; RT-qPCR	2b	si	no
10-698	2° trimestre	-	2,83	3	VDVB-1b VDVB-2b	AV; RT-qPCR	1b	si	no
11-411	sin dato	3	3	4	ambiguo	-	-	si	no
11-561	3° trimestre	4	4	4	ambiguo	-	-	si	si
11-652	3° trimestre	3	2	3,98	VDVB-1a VDVB-2b	AV; RT-nPCR; RT-qPCR	1b	si	no
12-344	sin dato	4,47	5	5,31	ambiguo	-	-	si	no
12-363	sin dato	5	4	3	VDVB-1a	-	-	si	si
12-425	3° trimestre	4,82	3,91	4	VDVB-1a	-	-	si	no
12-564	2° trimestre	4	3,91	3	VDVB-1a VDVB-1b	-	-	si	si
13-155	3° trimestre	3	4	4	VDVB-1b VDVB-2b	-	-	si	si

^a Media geométrica obtenida de la lectura de tres operarios y expresada en log₂; se consideraron positivas las muestras con títulos de anticuerpos neutralizantes iguales o superiores a 2 (dilución 1:4).

^b Interpretación según Bauermann y col. (2017) y Pecora y col. (2017).

Tabla A7 (continuación): Títulos de anticuerpos neutralizantes en muestras de fluidos de cavidad (n = 51)

Caso	Edad gestacional	Media geométrica títulos de AcN ^a			AcN predominante ^b	Detección del VDVB	Subtipo detectado	Lesiones microscópicas	Malformaciones congénitas
		VDVB-1a	VDVB-1b	VDVB-2b					
13-366	3° trimestre	3,42	3,63	3,63	ambiguo	-	-	si	no
14-249	2° trimestre	-	-	3	VDVB-2b	-	-	si	no
14-270	2° trimestre	3,78	3,91	3	VDVB-1a VDVB-1b	-	-	si	no
14-287	3° trimestre	4	3,63	3,3	ambiguo	RT-nPCR; RT-qPCR	1b	si	si
14-413	3° trimestre	3	3	3,63	VDVB-1a	-	-	si	si
14-512	neonato	3,3	8,28	3,63	VDVB-1b	-	-	si	no
14-717	neonato	4	4	2,45	VDVB-1a VDVB-1b	-	-	no	no
15-471	3° trimestre	2	5	3	VDVB-1b	-	-	si	si
15-483	neonato	2	4	4	VDVB-1b VDVB-2b	-	-	si	si
15-512	3° trimestre	2,29	4	4	VDVB-1b VDVB-2b	AV; ELISAag; RT-nPCR; RT-qPCR	1b	no	no
16-240	2° trimestre	2,83	3	5,74	VDVB-2b	-	-	si	si
16-478	3° trimestre	3	3,46	3,98	VDVB-2b	AV; RT-nPCR; RT-qPCR	1b	si	no
17-049	3° trimestre	-	2	2	VDVB-1b VDVB-2b	-	-	si	no

^a Media geométrica obtenida de la lectura de tres operarios y expresada en log₂; se consideraron positivas las muestras con títulos de anticuerpos neutralizantes iguales o superiores a 2 (dilución 1:4).

^b Interpretación según Bauermann y col. (2017) y Pecora y col. (2017).

Tabla A7 (continuación): Títulos de anticuerpos neutralizantes en muestras de fluidos de cavidad (n = 51)

Caso	Edad gestacional	Media geométrica títulos de AcN ^a			AcN predominante ^b	Detección del VDVB	Subtipo detectado	Lesiones microscópicas	Malformaciones congénitas
		VDVB-1a	VDVB-1b	VDVB-2b					
17-288	3° trimestre	-	4	4	VDVB-1b VDVB-2b	-	-	si	no
17-361	3° trimestre	3,91	2,71	4,64	VDVB-1a VDVB-2b	AV; RT-nPCR; RT-qPCR	1b	si	no
17-368	sin dato	4	2,88	5	VDVB-1a VDVB-2b	-	-	si	no
17-376	3° trimestre	2	7,23	7	VDVB-1b VDVB-2b	-	-	si	no
17-398	2° trimestre	3,42	3,91	3,3	ambiguo	-	-	si	no
17-482	3° trimestre	2	2,62	3	VDVB-1b VDVB-2b	-	-	no	no
17-532	3° trimestre	3	3,3	3,3	ambiguo	-	-	si	no
17-536	3° trimestre	2,3	3,3	4,64	VDVB-2b	-	-	si	no
18-354	3° trimestre	-	3,29	3,52	VDVB-1b VDVB-2b	-	-	si	no
10-308	2° trimestre	-	-	-	-	-	-	si	no
13-434	neonato	-	-	-	-	AV; RT-nPCR; RT-qPCR	1b	si	no
17-125	3° trimestre	-	-	-	-	-	-	si	no

^a Media geométrica obtenida de la lectura de tres operarios y expresada en log₂; se consideraron positivas las muestras con títulos de anticuerpos neutralizantes iguales o superiores a 2 (dilución 1:4).

^b Interpretación según Bauermann y col. (2017) y Pecora y col. (2017).

Tabla A8: Resultados de la prueba de saturación de sustitución nucleotídica por la prueba de Xia

Subtipo	Iss	Iss.c	p	Interpretación
1a	0,085	0,752	< 0,0001	Mínima saturación, secuencias aptas para filogenia
1b	0,047	0,727	< 0,0001	Mínima saturación, secuencias aptas para filogenia

Tabla A9: Estimaciones del *log marginal likelihood* de las diferentes combinaciones de modelos con los métodos *Path sampling* y *Stepping Stone sampling*. Los modelos seleccionados se muestran en formato negrita

Subtipo	Modelo sustitución	Modelo reloj molecular	Modelo demográfico	<i>Path sampling</i>	<i>Stepping stone sampling</i>
1a	K2P+G4	Estricto	Constante	-1404,63	-1404,65
		Estricto	Exponencial	-1396,31	-1396,80
		Estricto	<i>Bayesian Skyline</i>	-1401,02	-1401,43
		Estricto	<i>GMRF Bayesian Skyride</i>	-1401,38	-1401,46
		Relajado	Constante	-1395,67	-1395,84
		Relajado	Exponencial	-1391,53	-1392,13
		Relajado	<i>Bayesian Skyline</i>	-1393,05	-1393,27
		Relajado	<i>GMRF Bayesian Skyride</i>	-1393,95	-1393,96
1b	K2P+G4	Estricto	Constante	-1820,80	-1821,03
		Estricto	Exponencial	-1793,58	-1793,73
		Estricto	<i>Bayesian Skyline</i>	-1791,14	-1791,97
		Estricto	<i>GMRF Bayesian Skyride</i>	-1792,44	-1792,53
		Relajado	Constante	-1822,42	-1822,55
		Relajado	Exponencial	-1795,26	-1795,25
		Relajado	<i>Bayesian Skyline</i>	-1791,70	-1792,44
		Relajado	<i>GMRF Bayesian Skyride</i>	-1796,08	-1795,92

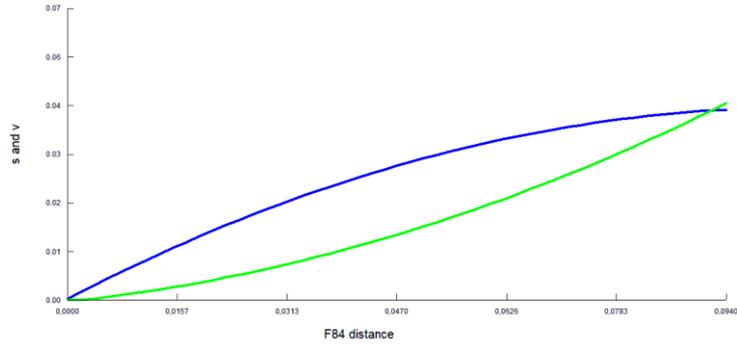


Figura A1: Representación gráfica del número de transiciones (S) y transversiones (V) frente a la distancia genética del conjunto de 105 secuencias del fragmento 5'UTR del VDVb-1b.

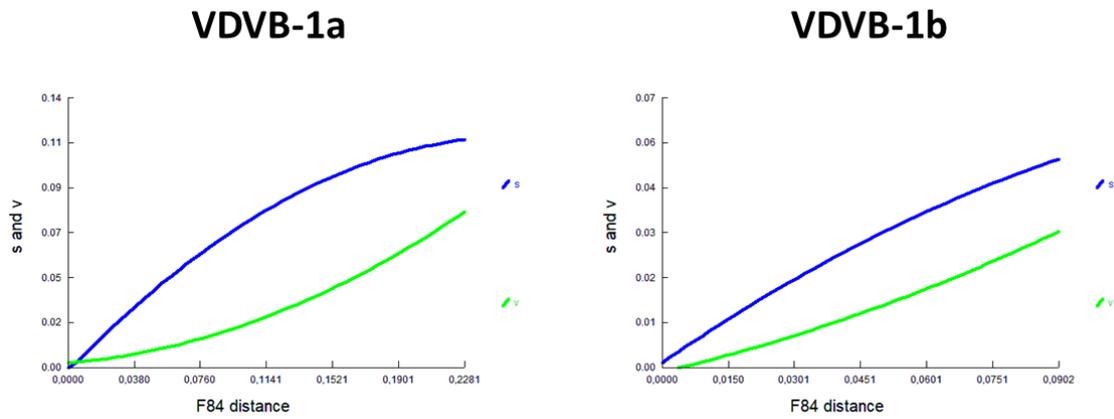


Figura A2: Representación gráfica del número de transiciones (S) y transversiones (V) frente a la distancia genética de los conjuntos de secuencias del fragmento 5'UTR del VDVb-1a y -1b.

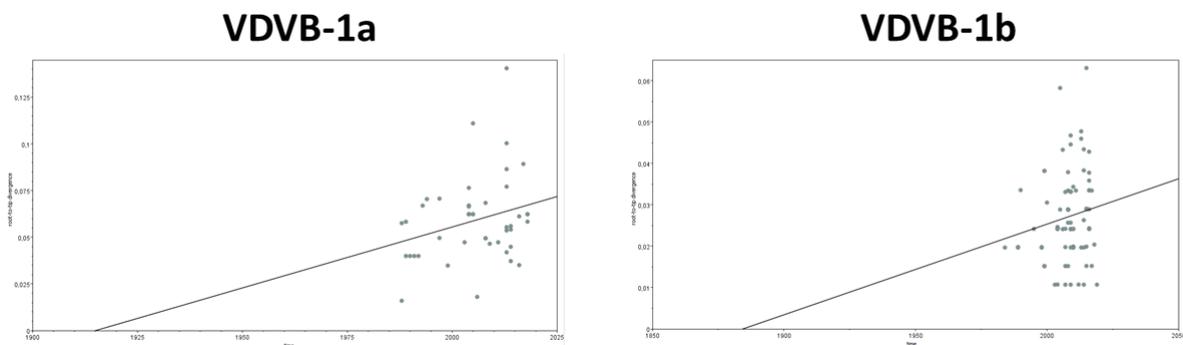


Figura A3: Análisis de regresión entre distancia genética y año de muestreo para los conjuntos de datos correspondientes al fragmento 5'UTR del VDVb-1a y -1b.