



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias

Cátedra de Microbiología

*Tesis presentada para optar por el grado académico de
Doctor/a en Ciencias Veterinarias*

***Desarrollo de técnicas diagnósticas que faciliten el
muestreo, diagnóstico y control de la Diarrea Viral
Bovina en establecimientos lecheros de la provincia de
Santa Fe***

Autor: Paula Favaro

Director/a: Andrea Pecora

Codirector/a: Luis Fernando Calvino

2025

*“No importa cuán estrecho haya sido el camino,
Ni cuantos castigos lleve mi espalda,
Soy el amo de mi destino, soy el capitán de mi alma.”*

William Ernest Henley

Esta tesis es fruto del trabajo de personas que han sido muy generosas conmigo.

Debo agradecer principalmente a Andrea Pecora, mi directora, por ser tan generosa conmigo, por estar pendiente en todo momento y por trabajar junto a mí, por su paciencia y por abrirme las puertas de su casa. A Luis Calvinho, mi co-director, por estar presente en cada paso y ayudarme a conseguir esta oportunidad. Ambos han sido un ejemplo de generosidad y humildad para mí, son mis maestros.

A todo el equipo del Lab. C de INTA Castelar por estar pendientes de mí y asistirme en cada semana que pasé en el INTA. No puedo olvidarme de Mari, que fue mi compañera todos los días en los viajes en el micro, gracias por hacer las estadías tan amenas. La familia de Andrea (Darío, Úrsula y Lara), que me ha abierto las puertas de su casa en varias ocasiones y que han sido muy cálidos conmigo. A Darío, que me ayudó desinteresadamente con la filogenia.

A la Universidad Nacional del Litoral por darme la oportunidad de formarme en mi carrera de grado como Médica Veterinaria y ahora en el posgrado. Me llena de orgullo ser parte.

Agradezco también al INTA por abrirme sus puertas y permitirme realizar este trabajo, sin su infraestructura y las excepcionales personas que lo forman, este trabajo no hubiera sido posible.

A mis compañeros de trabajo de la FCV, con quienes comparto charlas, mates, risas y saberes académicos. Especialmente a Betina Mariño y Paula Rejf, que me han acompañado en varios muestreos y me han guiado en el camino académico. Agradezco la ayuda desinteresada de José Bértoli, que fue fundamental en los muestreos a campo. Agradezco también a Gastón, por su buena predisposición en la Escuela Granja y a los chicos de la guardia del Hospital Escuela de Salud Animal que me acompañaron en varias ocasiones.

A mi familia, que ha sido pilar fundamental en mi desarrollo, cada uno me ha enseñado mucho de la vida. Han sido inspiración y modelos a seguir. A mi mamá, la persona más hermosa del mundo.

Mi compañero en la vida, Jorge, que es soporte, cable a tierra y que me muestra las cosas bellas de la vida. Y Melba, mi felina incondicional, que me acompaña en cada momento. Hacen la vida hermosa, son todo para mí.

A Humberto, el culpable de todo esto.

Sin ustedes, esto nunca hubiera ocurrido.

Índice

Resumen	IX
Abstract.....	X
Abreviaturas.....	XI
1. Introducción.....	1
1.1 Descripción de la enfermedad	1
1.2 Descripción del virus	1
1.2.1 Taxonomía.....	1
1.2.2 Propiedades del virus.....	1
1.2.3 Replicación	2
1.3 Transmisión, patogenia y cuadros clínicos	3
1.3.1 Transmisión.....	3
1.3.2 Patogenia y cuadros clínicos	4
1.4 Diagnóstico.....	7
1.4.1 Diagnóstico de la DVB.....	7
1.4.2 Utilización de papeles de filtro: Metodología <i>dried blood test</i> (DBT).....	9
1.5 Planes de control y vacunas.....	11
1.6 Situación en el país y en el mundo.....	15
1.7 Pérdidas económicas asociadas a la DVB.....	16
2. Objetivos	189
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos	19
3. Hipótesis.....	20
4. Materiales y métodos	22
4.1.1 Desarrollar un ELISA para detección de anticuerpos anti VDVB en muestras de suero y leche.	23
4.1.1.1 Obtención de la proteína recombinante	23
4.1.1.2 Generación de paneles de sueros y leches de tanque.....	24

4.1.1.3 Desarrollo del ELISA	24
Selección del formato del ELISA.....	24
Selección del tipo de placa.....	24
Concentraciones de proteína.....	24
Diluciones de los sueros positivos y negativos	24
Soluciones para dilución de sueros y conjugado	25
Evaluación de distintos tipos de bloqueo:	25
Diluciones del conjugado	25
Condiciones de los lavados	25
Controles.....	25
Sustrato de la enzima, solución de frenado y lectura.....	25
4.1.2 Realizar muestreos de BTM (<i>bulk tank milk</i>) en establecimientos lecheros de la provincia de Santa Fe y determinar la presencia de anticuerpos anti VDVB mediante un test de ELISA.....	26
4.2.1 RT-qPCR para la detección de VDVB en muestras de suero y semen.....	28
4.2.1.1 Especímenes	28
Cepas virales:	28
Plásmido:.....	28
Muestras de suero y semen.....	29
Muestras clínicas.....	30
4.2.1.2 Estandarización de la RT-qPCR.....	30
Extracción de ARN.....	30
Reacción de retro-transcripción y qPCR	30
Controles.....	31
Selección de <i>primers</i>	31
Ajuste de la concentración de <i>primers</i> y rango lineal de detección del plásmido	31
Sensibilidad analítica.....	32
Ensayos de precisión	32

Especificidad analítica	32
Ensayos inter-laboratorio.....	32
Análisis de los resultados	33
4.2.2 Muestreo y procesamiento DBT (<i>dried blood test</i>).....	33
4.2.2.1 Selección de papeles, eluyentes y matrices.....	33
Control de papeles utilizados.....	34
Evaluación del método de elución.....	34
4.2.2.2 Sangre sembrada en papeles	34
Porcentaje de recuperación de ARN respecto a la muestra fresca	34
Límite de detección.....	34
Almacenamiento y recuperación de ARN viral en distintas condiciones	35
Almacenamiento y recuperación de ARN viral en muestras clínicas.....	35
Prevención de la contaminación cruzada	35
4.2.2.3 Semen sembrado en papeles.....	36
Porcentaje de recuperación de ARN respecto a la muestra fresca	36
Sensibilidad en papeles de filtro	36
Determinación de los tiempos y temperaturas de conservación del ARN viral ...	36
4.2.3 Monitoreo de DVB en un establecimiento de producción de leche.....	37
Criterios de selección y características del establecimiento	37
Cuestionario a los encargados	37
Medidas adoptadas durante plan de saneamiento/monitoreo	38
Toma y procesamiento de muestras	39
4.2.4 Caracterización filogenética de cepas de VDVB de la provincia de Santa Fe	40
5. Resultados.....	23
5.1.1 Desarrollo de un ELISA para detección de anticuerpos anti VDVB en muestras de suero y leche.	43

5.1.2 Realización de muestreos de BTM en establecimientos lecheros de la provincia de Santa Fe y determinación de la presencia de anticuerpos anti-VDVB mediante un test de ELISA	44
5.2.1 RT-qPCR para la detección de VDVB en muestras de suero y semen.....	45
5.2.2 Muestreo y procesamiento DBT	49
Evaluación de método de elusión, control de papeles sin sembrar y porcentaje de recuperación respecto a la muestra fresca	49
Sangre sembrada en papeles.....	49
Semen sembrado en papeles.....	51
5.2.3 Monitoreo de la DVB en establecimientos de producción de leche	54
5.2.4 Caracterización filogenética.....	55
6. Discusión	58
7. Conclusiones	65
8. Bibliografía	67
Anexo I	81
Anexo II	83
Anexo III. Publicaciones	85

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Primers</i> utilizados en la RT-qPCR.....	31
Tabla 2. Casos clínicos sospechosos de Diarrea Viral Bovina presentados en el periodo 2019-2021 en el establecimiento estudiado.....	40
Tabla 3. Cepas secuenciadas durante el periodo 2019-2022 provenientes de casos clínicos de la provincia de Santa Fe	41
Tabla 4. Límite de detección del fragmento de interés para diferentes matrices.....	45
Tabla 5. Detección del fragmento de interés en pools de suero	46
Tabla 6. Valores de TM (temperatura de <i>melting</i>) para las cepas de <i>Pestivirus</i> bovinos detectadas por la RT-qPCR.....	46
Tabla 7. Repeticiones de controles positivos	47
Tabla 8. Comparación de técnicas diagnósticas (aislamiento viral y RT-qPCR) en muestras clínicas	47
Tabla 9. Límite de detección del <i>target</i> en distintas concentraciones para sangre contaminada en papeles.....	49
Tabla 10. Media de CT, número de determinaciones positivas entre las réplicas, desvío estándar y porcentaje de recuperación respecto al control positivo (fresco) de 1 día, 7 días, 6 meses y 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, 4°C, -20°C y -70°C para sangre contaminada sembrada en papeles de filtro.....	51
Tabla 11. Límite de detección del <i>target</i> en distintas concentraciones para semen contaminado sembrado en papeles.....	51
Tabla 12. CT (<i>cycle threshold</i>) de las 5 repeticiones de cada condición (tiempos y temperaturas) de almacenamiento de semen en papeles sin tratamiento con DTT	53
Tabla 13. CT (<i>cycle threshold</i>) de las 5 repeticiones de semen sembrado en papel cromatográfico con tratamiento previo con DTT y porcentaje de recuperación de la media de las repeticiones positivas	54
Tabla 14. Identificación, año de recolección, localidad de procedencia, cuadro clínico, genotipo, número de acceso al <i>GenBank</i> y porcentaje de homología de las 11 muestras secuenciadas provenientes de la provincia de Santa Fe	56

Índice de figuras

Figura 1. Estructura y organización genómica de los <i>Pestivirus</i>	2
Figura 2. Resumen de técnicas diagnósticas para el VDVB.....	11
Figura 3. Construcción del vector de clonación pET-28a(+) con el gen de la proteína NS3 truncada.....	23
Figura 4. Existencias de ganado lechero en la Provincia de Santa Fe.....	26
Figura 5. Muestras BTM positivas al ELISA para la detección de anticuerpos anti-NS3 respecto al total de muestras estudiadas por departamento de la provincia de Santa Fe.....	45
Figura 6. Rango lineal de detección y límite de detección (LOD) del plásmido 5'UTR del VDVB en la qPCR desarrollada..	45
Figura 7. Árboles filogenéticos que incluyen las cepas de los genotipos 1a, 1b, 1c, 2a, 2b y Virus HoBi-Like, identificadas por su nro. de acceso a <i>GenBank</i> y las cepas secuenciadas en el presente trabajo.....	57

Resumen

La Diarrea Viral Bovina (DVB) se presenta con múltiples cuadros y genera importantes pérdidas económicas a nivel mundial. La presente tesis tuvo como objetivo general mejorar las posibilidades diagnósticas de la DVB en rodeos lecheros de la provincia de Santa Fe, así como obtener datos actualizados de prevalencia y genotipos circulantes. Se desarrollaron técnicas y procedimientos diagnósticos que permitan facilitar la toma y remisión de muestras, la conservación del ARN viral y la detección molecular del virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), incluyendo una RT-qPCR, así como un método de procesamiento de muestras sembradas en papeles de filtro para preservar material genético viral. Además, se incluyeron estudios de estimación de prevalencia de anticuerpos anti-VDVB realizados en muestras de leche de tanque, un plan de monitoreo de la enfermedad en un establecimiento de la región y un estudio filogenético donde se clasificaron genéticamente las cepas del VDVB encontradas. Esta tesis permitió desarrollar una RT-qPCR altamente sensible que detecta todos los genotipos bovinos hallados en la región. Además, pudo recuperarse ARN del VDVB por hasta 12 meses en papel cromatográfico y tarjetas FTA. Respecto al establecimiento monitoreado, no se encontró circulación viral. Mediante una estimación de la prevalencia, se observó una alta circulación viral en la cuenca lechera de Santa Fe. Las muestras secuenciadas indican mayor circulación de genotipo 1b. Se logró obtener datos actualizados de la DVB en Santa Fe, que reflejan la necesidad de implementar planes de control a nivel regional.

Abstract

Bovine Viral Diarrhea (BVD) is a complex disease with several clinical manifestations that causes significant economic losses worldwide. The overall objective of this thesis was to improve the diagnostic possibilities of BVD in dairy herds in the province of Santa Fe, as well as to update data on prevalence and circulating genotypes. Diagnostic techniques and procedures were developed to facilitate sample collection and shipping, viral RNA preservation, and molecular detection of the Bovine Viral Diarrhea virus (BVDV), including a RT-qPCR technique and a method for processing samples sown in filter paper to preserve viral genetic material. In addition, studies estimating the prevalence of anti-BVDV antibodies in bulk tank milk samples, a disease monitoring plan at a dairy farm in the region, and a phylogenetic study to genetically classify the BVDV strains found were included. This thesis led to the development of a highly sensitive RT-qPCR that detects all bovine genotypes found in the region. In addition, BVDV RNA could be recovered for up to 12 months on chromatography paper and FTA cards. No viral circulation was found at the monitored dairy farm. Prevalence estimates showed high viral circulation in the dairy farms collected in Santa Fe. Sequenced samples indicate broader circulation of 1b genotype. Updated data on DVB in Santa Fe was obtained, reflecting the need to implement control plans at the regional level.

Abreviaturas

- 5'UTR: región no codificante 5'
- Ac: anticuerpo
- Ag: antígeno
- ARN: ácido ribonucleico
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- BTM: *bulk tank milk*, leche de tanque
- Buffer TE: Buffer Tris-EDTA
- CP: citopático
- CT: *cycle threshold*, valor umbral del número de ciclos
- DBT: *dried blood test*
- DICT: dosis infecciosa cultivo tejido
- DO: densidad óptica
- DTT: ditioneitol
- DVB: Diarrea Viral Bovina
- ELISA: enzimo-inmunoensayo
- FTA Cards: *Flinders Technology Associates*, Tarjetas FTA
- GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa bovina
- HVB-1: *Herpesvirus Bovino-1*
- HVB-5: *Herpesvirus Bovino-5*
- IF: inmunofluorescencia
- IHQ: inmunohistoquímica
- LOD: límite de detección
- MEM: *minimal essential medium*, medio mínimo esencial
- Medio LB: caldo de lisogenia
- MDBK: células *Madin Darby Bovine Kidney*
- NCP: no citopático
- NEC: *no extraction control*, control sin extracción
- ON: *overnight*, toda la noche
- pb: pares de bases
- PI: persistentemente infectados
- PI-3: *virus de Parainfluenza-3*

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción

RVA: *Rotavirus Bovino A*

SN: seroneutralización

SNE: suero normal equino

TA: temperatura ambiente

TM: temperatura de *melting*, temperatura a la cual el ADN doble cadena se disocia en simple cadena

VDVB: virus de la Diarrea Viral Bovina

VRSB: *Virus Respiratorio Sincicial Bovino*

VLA: *Virus de la Lengua Azul*

1.INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Descripción de la enfermedad

La Diarrea Viral Bovina (DVB) es una enfermedad infecciosa que afecta a bovinos mundialmente, caracterizada principalmente por trastornos reproductivos y respiratorios, que conllevan importantes pérdidas económicas, debidas a disminución en la producción de leche, disminución de la fertilidad en hembras (abortos, malformaciones y mortalidad embrionaria) y machos, menor ganancia de peso, inmunosupresión e incremento en las infecciones secundarias, diarreas, síndromes respiratorios, entre otros (Yarnall y Thrusfield, 2017). La extensión de la enfermedad depende del nivel de inmunidad del animal y la patogenicidad de la cepa del virus. El principal inconveniente que genera la DVB, desde el punto de vista epidemiológico, es la producción de animales con infección persistente o persistentemente infectados (PI), quienes representan la principal fuente de infección para sus convivientes (Moennig y Yarnall, 2021).

1.2 Descripción del virus

1.2.1 Taxonomía

La DVB es producida por virus pertenecientes a la familia *Flaviviridae* y clasificados dentro del género *Pestivirus*, junto con los virus de la Peste porcina clásica (o *Pestivirus C*) y de la Enfermedad de la frontera (o *Pestivirus D*). Históricamente, se conocían dos variantes del virus de la diarrea viral bovina, el VDVB-1 (actualmente denominado *Pestivirus A*) y el VDVB-2 (denominado *Pestivirus B*) (Smith et al., 2017). A partir del año 2004, se comenzó a reportar la circulación de otros virus del género *Pestivirus*, que recibieron en conjunto el nombre de virus HoBi-like o VDVB-3 (actualmente llamados *Pestivirus H*) (Caro et al., 2020; Ridpath y Neill, 2015; Schirrmeyer et al., 2004). Dentro del genotipo VDVB-1 se clasificaron 21 sub-genotipos, (denominados de la “a” a la “u”). Dentro del VDVB-2 y VDVB-3, existen 4 sub-genotipos (denominados de la “a” a la “d”).

1.2.2 Propiedades del virus

Los virus de la familia *Flaviviridae* son esféricos, con un tamaño aproximado de 40-60 nm y poseen una envoltura desde la cual se extienden glicoproteínas que rodean una cápside icosaédrica. El genoma consiste en una molécula simple de ARN monocatenario de sentido positivo con un tamaño de 12,3 kb. El genoma codifica la síntesis de una poliproteína flanqueada por los sectores 5' y 3' UTR (*untranslated region*) y que es clivada en 4 proteínas estructurales

(C, Erns, E1 y E2) y 7-8 no estructurales (Npro, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Deregt et al., 2005) (Figura 1).

Los *Pestivirus* bovinos se clasifican en biotipos de acuerdo a su capacidad de producir efectos citopáticos en cultivos celulares. De esta manera, se conoce el biotipo citopático (CP) que produce lisis celular y el biotipo no citopático (NCP), que no produce efectos observables en cultivos celulares (Brodersen, 2014).

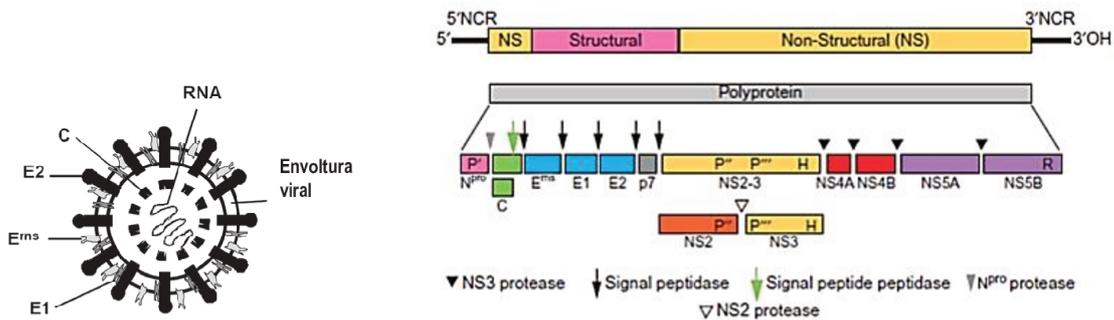


Figura 1. Estructura y organización genómica de los *Pestivirus*. Izquierda: Representación esquemática del virión del VDVB. El VDVB está constituido por 3 proteínas de envoltura (Erns, E1 y E2) y la proteína de la cápside viral la cual empaqueta el ARN genómico. Modificado de: Vargas, D., Jaime, J. y Vera, V. (2009). Derecha: Organización genómica de los *Pestivirus*. En la parte superior se encuentra el genoma viral con las regiones que codifican proteínas estructurales y no estructurales y las regiones no codificantes 5' y 3'. Las cajas debajo del genoma indican las proteínas virales generadas por la cascada de procesamiento proteolítico. Las flechas y puntas de flechas entre las cajas de proteínas virales representan los sitios de clivaje de proteasas. Las Proteínas no estructurales están indicadas como NS. P', P'', P''', H y R indican la localización de la proteasa de Npro, la proteasa de NS2, la proteasa de NS3, la helicasa de NS3 y la ARN polimerasa- ARN dependiente de NS5B, respectivamente. En VDVB NCP, el clivaje de NS23 es detectable solo por un corto periodo de tiempo luego de la infección. En VDVB CP, la NS2 y NS3 son producidos continuamente. Modificado de: Fenner's Veterinary Virology. Quinta edición. MacLachlan y Dubovi (2017).

1.2.3 Replicación

La adhesión del virus a la célula está mediada por la glicoproteína E de la envoltura que interactúa con receptores de la membrana celular. La entrada a las células diana se produce a través de la endocitosis mediada por receptores y la replicación ocurre en el citoplasma. La replicación implica la síntesis de ARN complementario de sentido negativo que luego sirve de molde para la síntesis de ARN de sentido positivo (genómico). La traducción del ARN mensajero resulta en la producción de una poliproteína que luego es clivada y procesada para formar las proteínas estructurales y no estructurales del virus. El ensamblaje ocurre en las membranas del retículo endoplásmico, luego el virión formado es transportado en vesículas por la vía secretoria hacia la membrana y liberado por exocitosis o lisis celular (MacLachlan y Dubovi, 2017).

1.3 Transmisión, patogenia y cuadros clínicos

1.3.1 Transmisión

El VDVB puede ser transmitido de forma vertical u horizontal. La transmisión transplacentaria puede ocurrir en cualquier momento de la gestación y las consecuencias de la infección viral en el feto dependen principalmente del momento en que ocurre la infección y de la cepa que lo infecta. La forma horizontal de transmisión puede ser directa a través de aerosoles y contacto nariz con nariz o indirecta por contacto de animales susceptibles con secreciones (semen, secreción nasal, ocular, orina, leche, saliva o líquidos fetales) de animales infectados o con objetos, materiales y alimentos contaminados. Los animales PI representan la principal fuente de infección a través de sus secreciones, ya que contienen una carga viral mucho mayor que los animales transitoriamente infectados, y pasan toda su vida dispersando virus a través de ellas. Por otro lado, los animales con la infección aguda, pueden ser fuente de infección, pero por un corto periodo de tiempo (una semana o menos) y con una menor carga viral (Goyal y Ridpath, 2005). Por ejemplo, la carga viral en leche de una vaca con infección transitoria es aproximadamente de $10^{2.5}$ DICT₅₀/mL, mientras que en vacas PI la carga viral en leche es de $10^{5.5}$ – $10^{6.5}$ DICT₅₀/mL (Radwan et al., 1995). La carga viral en suero de un animal PI es de 10^4 – 10^5 DICT₅₀/mL (Bolin et al., 1985) y en semen llega hasta 10^6 DICT₅₀/mL (Revell et al., 1988). El semen proveniente tanto de animales con la infección transitoria como de animales PI es una importante fuente de infección. Además, en forma atípica, algunos toros que sufren la infección transitoria y se recuperan, pueden presentar una infección persistente en los testículos, liberando virus en semen (Givens et al., 2009; Nugroho et al., 2022; Voges et al., 1998).

Hay dos formas por las cuales un feto puede adquirir la infección persistente. Por un lado, un feto proveniente de una madre PI siempre nacerá persistentemente infectado. Por otro lado, la infección de la madre (no PI) hasta los 125 – 150 días de preñez con un virus NCP, resultará en la infección del feto y el nacimiento de un ternero PI (Brodersen, 2014), siendo esta última la forma más frecuente.

Otras formas de transmisión son la transferencia embrionaria, iatrogénica (reutilización de agujas y guantes de palpación rectal), insectos que trasladen mecánicamente el virus y el uso de vacunas vivas modificadas. Además de los bovinos, otras especies del orden *Artiodactyla* pueden ser reservorios de *Pestivirus* bovinos, como porcinos, ovinos, caprinos, llamas, alpacas y especies salvajes (Decaro et al., 2012; Goyal et al., 2002). La introducción al rodeo también puede darse a partir de productos biológicos que contengan suero fetal bovino contaminado con *Pestivirus* bovinos (Pecora et al., 2016; Pinheiro de Oliveira et al., 2013).

1.3.2 Patogenia y cuadros clínicos

Infección posnatal en animales no preñados sin inmunidad:

El virus ingresa al animal susceptible a través de las mucosas de la boca o nariz y realiza una replicación primaria en las células epiteliales y las tonsilas. Luego, se disemina libre en suero o a través de leucocitos infectados, principalmente linfocitos, monocitos, linfoblastos y precursores de macrófagos (Rondón, 2006) hacia el resto del organismo. El periodo de incubación dura de 5 a 7 días (MacLachlan y Dubovi, 2017) y la enfermedad se mantiene hasta que se desarrolla la inmunidad, dos semanas después de la entrada del virus al organismo (Lanyon et al., 2014). Durante este periodo se observa viremia que se relaciona con leucopenia, linfopenia y/o trombocitopenia, apoptosis en el timo, inmunosupresión, pirexia y diarrea. La infección aguda de los animales resulta en destrucción de tejido linfoide y la consecuente inmunosupresión (Chase et al., 2004). Los linfocitos y macrófagos son células diana para el VDVB, por tanto, durante la infección aguda, existe una depleción de linfocitos B, T (CD4 y CD8) y neutrófilos (Ellis et al., 1988), debida principalmente a una menor estimulación de la mitosis de los leucocitos infectados y a una menor producción de interferón, interleucinas y citotoxicidad (Peterhans et al., 2003). Como consecuencia de la inmunosupresión, pueden establecerse otros microorganismos como *Mannheimia haemolytica*, herpesvirus bovino tipo 1, virus respiratorio sincicial, rotavirus, coronavirus, *Salmonella* y *E.coli* (Potgieter, 1997; Ridpath, 2010).

Los cuadros clínicos que pueden producirse como consecuencia de la infección por VDVB son muy variados y dependen principalmente de la edad y el estado fisiológico del animal infectado, de la cepa del virus actuante, del estado inmunitario, entre otros factores. La infección luego del nacimiento resulta en la infección transitoria o aguda y los cuadros pueden ser inaparentes, moderados o graves. El 60 a 70% de los casos de infección transitoria cursan de forma asintomática (Goyal y Ridpath, 2005). Los anticuerpos calostrales protegen contra la infección por VDVB hasta los 6 meses de edad (Baker, 1995), por ello, los cuadros de DVB se empiezan a observar a partir de esta edad. Las infecciones agudas asintomáticas se caracterizan por producir un leve aumento de temperatura, leucopenia, viremia de corta duración, eliminación de virus por pocos días y seroconversión a VDVB. Las infecciones asintomáticas se asocian con disminuciones en la producción de leche en animales de tambo (Moerman et al., 1994). Las formas agudas sintomáticas cursan con fiebre, depresión, anorexia, leucopenia, descarga nasal y ocular, lesiones en la boca (erosiones y úlceras), diarrea, disminución en la producción de leche, viremia corta (15 días) y diseminación viral por corto tiempo (Goyal and Ridpath, 2005). Los cuadros más severos generalmente se asocian con el VDVB-2 e incluyen fiebre, trombocitopenia, diarrea sanguinolenta, petequias y equimosis en las superficies

mucosas, epistaxis, hemorragias en múltiples sitios, leucopenia y muerte (Corapi et al., 1990). Los cuadros son acompañados por inmunosupresión que los complica con agentes secundarios (*Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, virus Respiratorio Sincicial Bovino) generando distrés respiratorio con neumonías.

La recuperación completa en animales transitoriamente infectados suele ocurrir a las 3 semanas si otras infecciones no empeoran el cuadro (Lanyon et al., 2014).

Infección en hembras preñadas:

La infección de hembras preñadas tiene diversas consecuencias que dependen principalmente del momento de la gestación en que se infectan y la cepa del virus actuante. Los efectos incluyen disfunción ovárica, dificultades en la concepción, muerte embrionaria, abortos, malformaciones y alteración del ambiente uterino. El embrión comienza a ser susceptible a la infección del virus a partir de los 20 días de la concepción, ya que previo a esto, no puede atravesar la zona pelúcida (Singh et al., 1982). Durante los días 21 a 41 después de la concepción, los efectos del virus en el feto conducen a muerte embrionaria y disminución en las tasas de preñez. El aborto puede ocurrir cuando el feto se infecta a partir de los 40 días de gestación y en cualquier momento de ésta. La expulsión del feto puede darse inmediatamente después del aborto, o tiempo después, siendo común encontrar momificaciones (Grooms, 2004).

La infección persistente ocurre cuando el feto se infecta con una cepa NCP del virus entre los 45 a 125 días de preñez (Caro et al., 2020). El virus tiene la capacidad de inhibir la secreción de Interferón tipo I en el feto, lo que permite su supervivencia y el establecimiento de la infección persistente (Charleston et al., 2001; Decaro et al., 2013). La consecuencia de la infección del feto en esta etapa determina la producción de un ternero inmunotolerante al VDVB y seronegativo. Esto se produce dado que el sistema inmune del feto, en este periodo de gestación, es incapaz de reconocer al VDVB como extraño y de reaccionar contra él. Como consecuencia, al nacer, el ternero PI elimina grandes cantidades de virus en todas sus secreciones y representa una fuente de infección para sus convivientes. Los animales PI pueden parecer clínicamente sanos o estar más predispuestos a infecciones secundarias, con crecimiento retardado y bajas ganancias de peso diarias (Lanyon et al., 2014). El 50% de los animales PI muere antes de cumplir un año de vida (Duffell y Harkness, 1985; MacLachlan and Dubovi, 2017). Cabe resaltar que el animal PI es inmunotolerante a la cepa de VDVB que originó la infección intrauterina, pero las infecciones con otras cepas de VDVB pueden generar una cierta respuesta inmune (Fulton et al., 2003). La tolerancia es mantenida por linfocitos T CD4 y B no reactivos, pero las células presentadoras de antígenos reaccionan normalmente, por lo tanto, el sistema inmune puede montar una respuesta ante otros patógenos (Glew y Howard, 2001).

Luego de los 125 días de preñez, el VDVB puede atravesar la placenta y la barrera hematoencefálica cerebral produciendo lesiones en el sistema nervioso central, incrementándose los efectos a medida que se incrementa la edad fetal. Estas malformaciones incluyen atrofia o hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, degeneración ocular, cataratas, atrofia retinal, lesiones esqueléticas en miembros, artrogrifosis, braquignatismo mandibular, alopecias e hipotricosis, debidas a una disfunción tiroidea fetal que resulta en niveles bajos de hormonas T3 y T4 (Rondón, 2006). La infección en esta etapa de la gestación también puede derivar en muerte fetal y aborto. Las lesiones encontradas en el feto incluyen: vasculitis en cerebelo, edema de la sustancia blanca y necrosis, hidrocefalia e hipomielinización que llevan a hipoplasia cerebelar y ataxia al nacimiento (Lanyon et al., 2014). Los mecanismos por los cuales el virus produce daño en el feto incluyen inhibición del crecimiento y diferenciación celular y lisis (Castrucci et al., 1991).

Las infecciones en el último periodo de la preñez pueden resultar en el nacimiento de terneros normales o débiles y seropositivos.

Infección persistente y enfermedad de las mucosas:

La enfermedad de las mucosas ocurre cuando un animal persistentemente infectado se sobreinfecta con una cepa CP de origen exógeno o endógeno (por mutación de la cepa NCP residente) (Weber et al., 2016) y es siempre fatal. Para que esto ocurra, la cepa CP que superinfecta al animal PI debe ser antigénicamente homóloga a la cepa NCP residente. Los efectos del virus en las placas de Peyer llevan a depleción linfocítica y atrofia. Desaparecen las microvellosidades de la lámina propia y la necrosis de los queratinocitos del estrato espinoso produce la disrupción de las uniones intercelulares del epitelio queratinizado de la cavidad oral, esófago, rumen y omaso, lo que desencadena las erosiones y úlceras que producen diarrea y deshidratación y facilita el accionar de bacterias oportunistas pudiendo terminar en septicemia. La muerte ocurre a los pocos días o semanas (Odeón et al., 2003).

La enfermedad de las mucosas aguda se presenta a los 7-14 días luego de la superinfección con una cepa CP homóloga a la NCP residente (Radostits y Littlejohns, 1988). Se caracteriza por fiebre, deshidratación, anorexia, taquicardia, polipnea, diarrea acuosa, descarga nasal y ocular y salivación excesiva. La diarrea se caracteriza por presentar restos de mucosa intestinal, membranas fibrinosas y sangre. Se encuentran erosiones y úlceras en la cavidad oral y a lo largo de todo el aparato digestivo, así como en el espacio interdigital, vulva, prepucio y pezones. La muerte generalmente se da entre los 3 a 10 días en el 100% de los afectados (Goyal and Ridpath, 2005). También existe una presentación de tipo crónica que se presenta cuando la cepa que superinfecta es heteróloga a la residente, con bajas ganancias de peso, diarreas

intermitentes, anorexia y pérdida de peso. Normalmente mueren antes de los 18 meses por debilidad generalizada.

Infección en toros:

La infección en toros reproductivamente activos puede resultar en disminución de la densidad espermática y motilidad y anormalidades espermáticas. Se ha demostrado que el VDVB puede permanecer en las vesículas seminales y próstata por más de dos años luego de la infección aguda, siendo eliminado en semen con el eyaculado (Givens et al., 2003; Kirkland et al., 1991).

1.4 Diagnóstico

1.4.1 Diagnóstico de la DVB

Existen diversas técnicas complementarias de laboratorio para el diagnóstico de la DVB: algunas se utilizan para el diagnóstico directo del agente: aislamiento viral, detección de antígeno (Ag) y detección de ácidos nucleicos (ARN) y otras para el diagnóstico indirecto, o sea, la detección de anticuerpos (Ac): serología.

El aislamiento viral se ha considerado la metodología “*gold standard*” para el diagnóstico de las enfermedades virales, incluida la DVB (Saliki and Dubovi, 2004). Sin embargo, en los últimos años ha entrado en desuso debido a los costos en su realización y al tiempo que lleva obtener resultados. A pesar de ello, se sigue utilizando en casos donde se pretende obtener y estudiar las cepas circulantes en el medio. El uso del aislamiento viral para diagnóstico ha sido reemplazado por otras técnicas rápidas de detección de Ag o ácidos nucleicos (Spetter et al., 2020). En animales menores de 6 meses, la utilización de la técnica de aislamiento viral no es adecuada debido a la posible interferencia con los Ac maternos (Goyal and Ridpath, 2005).

Las técnicas de detección de Ag incluyen principalmente la inmunofluorescencia (IF), inmunohistoquímica (IHQ) y el enzimo-inmunoensayo (ELISA). La IHQ se utiliza en tejidos fijados con formalina, permite detectar casos de animales con infección transitoria o PI, pero suele ser laboriosa y costosa. La inmunofluorescencia se realiza a partir de tejido fresco o congelado, dando resultados rápidos, sin embargo, requiere la intervención de técnicos altamente calificados para la observación de resultados (Dubovi, 2013). Los ELISA permiten detectar Ag en suero, biopsia de piel o leche de animales individuales, pero debe usarse con precaución ya que existe interferencia con los Ac calostrales en animales menores de 6 meses (Spetter et al., 2021a). La mayoría de estos test ELISA se basan en la detección de la proteína NS3, mediante el uso de un anticuerpo de captura unido a la fase sólida y un anticuerpo detector conjugado a un sistema de señal como la peroxidasa (Kirkland, 2018). En los últimos años, se han desarrollado

kits comerciales de inmunocromatografía que permiten detectar antígeno viral (NS3) del VDVB con resultados rápidos y que pueden realizarse al pie del animal, aunque con una sensibilidad menor que los métodos moleculares (Kameyama et al., 2006).

El *gold standard* para la detección de Ac contra el VDVB es la seroneutralización (SN). Permite detectar y cuantificar Ac específicos contra el VDVB y puede usarse para realizar seroconversión en muestras pareadas para identificar infecciones recientes. También debe realizarse en animales mayores a 6 meses, pues existe la interferencia con anticuerpos maternos. La SN es genotipo-específica, puesto que los anticuerpos generados contra un genotipo del VDVB, no siempre presentan reacción cruzada con los demás genotipos, por tanto, para realizar la prueba deberían utilizarse virus de los genotipos circulantes en la región geográfica (Sandvik, 1999; Weber et al., 2014). Como ventaja, la SN es muy específica, sin embargo, resulta lenta, costosa y requiere del trabajo con cultivos celulares. En contraposición, los ELISA de competición o bloqueo, arrojan resultados rápidos sin el uso de cultivos celulares (Bhatia et al., 2008). En el mercado hay disponibles kits de ELISA que permiten diferenciar anticuerpos vacunales de los producidos por infección. La mayoría de estos kits están desarrollados a base de la proteína NS3 del virus, una proteína no estructural que se forma durante la replicación del virus, por tanto, los anticuerpos contra esta proteína no se formarían como respuesta a la inmunización con vacunas inactivadas o a subunidades (Eiras et al., 2012; Mahmoodi et al., 2015; Makoschey et al., 2007; Raue et al., 2011). En regiones con alta prevalencia de infecciones por VDVB, las pruebas serológicas no tienen mucho valor diagnóstico, a menos que pueda establecerse seroconversión, y no permiten detectar animales PI (Kirkland, 2018).

En los últimos años, la RT-PCR y RT-PCR en tiempo real o RT-qPCR han ganado gran protagonismo en el laboratorio como técnicas de rutina en el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Moorthy et al., 2019; Saliki y Dubovi, 2004). Son técnicas rápidas y de alta sensibilidad que permiten la detección del ARN del VDVB. Una gran ventaja de la RT-qPCR es que puede utilizarse en *pools* de muestras (Akagami et al., 2020; Renshaw et al., 2000). Por ejemplo, en rodeos lecheros, puede identificarse la presencia de animales PI entre los animales en lactación en una muestra de leche de tanque, lo mismo ocurre con muestras de suero individuales que pueden *poolarse* para la detección de animales PI con el fin de realizar saneamientos en el rodeo (Kennedy, 2006). Con el objetivo de disminuir los costos de los análisis de laboratorio a la hora de realizar un programa de saneamiento en rodeos, se han descrito varias estrategias de armado de *pools* de acuerdo a la prevalencia estimada de animales PI (Muñoz-Zanzi et al., 2000). Una desventaja de estas técnicas moleculares, es que permiten detectar o cuantificar ácidos nucleicos, pero no virus infeccioso, como sí lo hace el aislamiento

viral (Dubovi, 2013). Sin embargo, como ventaja, los resultados no son influidos por la presencia de anticuerpos calostrales, por tanto, puede utilizarse para determinar el estado de PI en animales de cualquier edad.

La confirmación del status de PI de un animal debe hacerse con dos muestreos consecutivos tomados con una diferencia de 3 – 4 semanas con resultados positivos a una prueba de diagnóstico directo (aislamiento viral, detección de Ag o de ácidos nucleicos) (Goyal and Ridpath, 2005).

En la Figura 2 puede observarse un resumen de las posibilidades diagnósticas para la DVB.

1.4.2 Utilización de papeles de filtro: Metodología *dried blood test* (DBT)

Los papeles de filtro se utilizan en diversas áreas como la medicina forense y estudios genéticos para conservar ácidos nucleicos a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo. Los más utilizados son las Tarjetas FTA (o FTA Cards, por sus siglas en inglés: Flinders Technology Associates), que consisten en un papel de filtro impregnado con una mezcla de desnaturalizantes químicos y sustancias que atrapan los radicales libres. Sus componentes químicos lisan las células, previenen el crecimiento bacteriano y desnaturalizan proteínas, sin embargo, los ácidos nucleicos son capturados en la matriz (Cardona-Ospina et al., 2019). De esta manera, su uso presenta dos ventajas: la conservación de ARN o ADN sin la necesidad de mantener cadena de frío y la seguridad durante la manipulación y traslado, por lo que pueden ser enviados por correo postal.

Las tarjetas FTA también han sido utilizadas para almacenar muestras con la posterior detección molecular de material genético de virus ADN y ARN, como el virus de la Fiebre Aftosa, Rabia, virus de la Enfermedad de Newcastle, Herpesvirus Bovino, entre muchos otros (Muthukrishnan et al., 2008; Perozo et al., 2006; Picard-Meyer et al., 2007; Sarangi et al., 2018). Esta metodología es sumamente beneficiosa para almacenar material genético de virus ARN, debido a su baja estabilidad y la degradación por ARNasas (Skonieczna et al., 2016). El uso de tarjetas FTA como matriz para la toma de muestras veterinarias fundamenta su aplicación en áreas alejadas de los laboratorios de diagnóstico y con insuficiente infraestructura donde se dificulta la logística para el traslado y conservación de muestras a temperaturas adecuadas. Además, la metodología es poco invasiva y fácil de utilizar, puesto que se necesita sólo una gota de sangre que fácilmente puede ser tomada a campo (Ivanovaa et al., 2017).

En cuanto a la utilización de papeles de filtro para conservar ARN de VDVB, existe escasa bibliografía. El primero de los trabajos publicados describe el almacenamiento de ARN viral proveniente de muestras de sangre y suero sembradas en cuatro tipos de papeles diferentes por un tiempo máximo de 6 meses, usando una PCR de punto final para la detección (Vilcek et al.,

2001). Más recientemente, se describió la detección de agentes patógenos del Complejo Respiratorio Bovino, incluido el VDVB, mediante RT-qPCR en muestras de hisopados nasales impregnados en tarjetas FTA y almacenados en temperaturas de -27°C a 46°C por hasta 14 días, observando total concordancia en la detección de ARN en papeles en comparación con muestras frescas (Liang et al., 2014). Por último, un estudio comparó los resultados en CT (*cycle threshold*) de una PCR en tiempo real realizada a partir de muestras frescas (sangre) y en tarjetas FTA (sangre e hisopado nasal) provenientes de animales PI. Si bien se observó un aumento de 1 o 2 logaritmos en el valor de CT - lo que indicaría una pérdida de sensibilidad con respecto a la muestra fresca-, la detección del virus en las dos matrices evaluadas (papel vs sangre fresca) tuvo total concordancia (Foster et al., 2014).

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	+	+++	++	+++	–	–
Detección de antígeno mediante ELISA	++	+++	+++	+++	+++	–
Detección de antígeno mediante IHC	–	–	–	++	–	–

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección de ácido nucleico mediante RT-PCR en tiempo real	+++	+++	+++	+++	+++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	+++	++	+++	–	+++	+++
VN	+	+++	++	–	+	+++

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable. Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables. ELISA = enzimoimmunoanálisis; IHC = inmunohistoquímica; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; VN = neutralización del virus.

Figura 2. Resumen de técnicas diagnósticas para el VDVB. Extraído de: Manual Terrestre de la OIE, Capítulo 3.4.7 – Diarrea viral bovina (Kirkland, 2018).

1.5 Planes de control y vacunas

Los programas de control de la DVB deberían ejecutarse siempre que la inversión para llevar a cabo el programa dentro de un tiempo determinado minimice efectivamente las pérdidas debidas a la enfermedad: y que su costo sea menor que las pérdidas asociadas a la DVB (Givens y Newcomer, 2015).

En la literatura, existen dos enfoques para el control de la DVB, llamados “control no sistemático” y “control sistemático”. El primero incluye medidas implementadas sin ningún

esfuerzo coordinado ni beneficios de acciones simultáneas en numerosos rodeos y generalmente incluyen sólo la vacunación. El control sistemático, en cambio, incluye una serie de medidas que se toman guiadas por un objetivo común, implementadas a nivel regional o nacional, con constante monitoreo y evaluación de los resultados (Lindberg y Houe, 2005).

Las estrategias de control planificadas a nivel regional o nacional son más efectivas que cuando se realizan a nivel de rodeo individual. Los esfuerzos para controlar la DVB en un establecimiento aislado pueden no servir de nada si en los establecimientos vecinos no se eliminan los animales infectados puesto que el riesgo de reinfección del establecimiento es alto (Houe, 2003). En este sentido, es deseable la intervención de las autoridades sanitarias estatales para promover planes de control, e incluso, para la toma las decisiones que determinen que el control de la enfermedad sea obligatorio y que realicen la inversión necesaria para llevarlo a cabo.

Durante años, el control de la DVB se ha realizado exclusivamente a través de la vacunación, sin embargo, los resultados de la utilización de vacunas sin la aplicación de otras medidas de bioseguridad no han sido satisfactorios (Antos et al., 2021; Nugroho et al., 2022). Actualmente, está comprobado que los programas de control más efectivos se basan en un modelo sistemático que incluye la determinación del status del rodeo, seguida de la implementación de medidas que impidan el ingreso del virus en rodeos libres, o eliminen su circulación en rodeos infectados. Los países escandinavos han llevado a cabo estos modelos de saneamiento desde principios de los 90' y la mayoría de ellos son libres de VDVB o están cerca de serlo (Moennig y Yarnall, 2021). Los planes de control de VDVB han comenzado a ser obligatorios en algunos países como Austria, Suiza y también en países con un stock ganadero muy grande como Alemania; o voluntarios como en Escocia, Irlanda e Inglaterra (Reichel et al., 2008; Wernike et al., 2017). Estos programas de control se basan en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad e incluyen de manera voluntaria la vacunación, aunque en algunos de ellos, como los países escandinavos, la vacunación está prohibida (Moennig y Yarnall, 2021). Analizando los programas de saneamiento realizados por distintos países, los que han llevado a cabo programas de adhesión obligatoria (Suiza, Alemania), han tenido mejores y más rápidos resultados que los que fueron de adhesión voluntaria (Inglaterra, España) (Azbel-Jackson et al., 2018; Villaamil et al., 2020).

La clave de todos los programas de control sistemáticos radica en la detección de los animales PI. Para eliminar el virus de un rodeo infectado, es indispensable detectar y eliminar estos animales, que son indefectiblemente la fuente de infección. En las poblaciones bovinas, la prevalencia de animales con infección persistente es alrededor del 1%. Algunos autores indican que cuando todos los animales PI son eliminados de un rodeo, se detiene la circulación viral

(Lindberg y Houe, 2005). Cuando los animales PI son detectados y eliminados del rodeo, se da un fenómeno de “*self-clearance*” porque al eliminar estos individuos PI, falla la propagación de las infecciones persistentes y el virus desaparece del rodeo (Ståhl y Alenius, 2012).

Los modelos actuales de saneamiento del VDVB se basan en tres premisas: 1. Medidas de bioseguridad para impedir el ingreso del virus en rodeos libres. 2. Detección y eliminación de animales PI para eliminar la circulación viral. 3. Monitoreo constante de los rodeos libres para detectar la introducción del virus tempranamente (Newcomer, 2021). Como complemento a estas premisas fundamentales, puede adicionarse opcionalmente la vacunación.

Cuando no se conoce la situación epidemiológica del establecimiento lechero en particular, resulta conveniente realizar un método de *screening*, como la serología de leche de tanque, para conocer si existe circulación viral en el establecimiento (Wernike et al., 2017).

La estrategia de eliminación de animales PI se basa en el testeo de todos los animales del rodeo para identificar a los que resulten PI y eliminarlos, seguido por el testeo de todos los terneros nacidos al año siguiente (Van Duijn et al., 2019). Esta clasificación se realiza una sola vez en la vida del animal, en chequeos siguientes, solo se controlan los animales que ingresan al rodeo y, en caso de que sea adquirido externamente, el semen.

Como se mencionó anteriormente, los animales PI suelen ser seronegativos, por lo tanto, la detección debe realizarse a partir de pruebas de diagnóstico directo, dado que las serologías positivas no tienen valor diagnóstico para la identificación de PI. En algunos establecimientos, se realiza un testeo serológico con posterior testeo de los animales seronegativos para confirmar si son PI (Houe et al., 2006). Sin embargo, esta puede ser una decisión riesgosa, puesto que un bajo porcentaje de animales PI pueden ser seropositivos, por lo que se podrían dar falsos negativos que continuarían con la transmisión viral dentro del rodeo (Goyal y Ridpath, 2005).

La serología tiene valor en regiones libres donde la vacunación está prohibida o en desuso, ya que permite detectar tempranamente circulación viral. En países con alta prevalencia y con vacunación ampliamente utilizada, tiene escasa utilidad, a menos que se utilicen técnicas diagnósticas que diferencien anticuerpos vacunales de anticuerpos infecciosos (Van Campen, 2010).

Las medidas de bioseguridad a implementar en los programas de control incluyen: el control en el desplazamiento de animales, control del contacto del rodeo con establecimientos vecinos, la realización de cuarentenas y testeo de animales que ingresen al rodeo, utilización de semen certificado libre de VDVB, control en el ingreso del personal, entre otras (Vargas et al., 2009).

El monitoreo constante se realiza para detectar introducciones del virus en etapas tempranas que permitan tomar medidas para asegurar el mantenimiento de condición "libre de

DVB” del rodeo. Esto puede hacerse a partir de pruebas serológicas a nivel de rodeo, como el testeo de leche de tanque en rodeos lecheros, que permite conocer el estado inmunológico de un gran porcentaje de los animales que componen el rodeo con una sola muestra (Larghi, 2018). Estas pruebas serológicas nos permiten monitorear y confirmar el status libre de un establecimiento e identificar si el VDVB es introducido al rodeo (Wernike y Beer, 2022).

Los programas de erradicación de países como Suecia, Suiza y Alemania incluyeron, en etapas finales y de forma complementaria la secuenciación de las cepas aisladas en casos de reintroducción del virus a rodeos. De esta manera, mediante análisis filogenéticos, se permite establecer una relación entre los casos y rastrear desde dónde procede la infección y realizar un seguimiento de los eslabones en la cadena de infección (Ståhl y Alenius, 2012).

En algunos países, como Alemania y Estados Unidos, los planes de control incluyeron también la vacunación, principalmente, para evitar grandes pérdidas económicas ante posibles reinfecciones de los rodeos (Larghi, 2018).

Resulta importante destacar que algunos animales salvajes u otras especies domésticas como ovinos y caprinos pueden comportarse como reservorios y transmitir el virus, por tanto, los esfuerzos para controlar la enfermedad deben también abocarse a estos animales (Evans y Reichel, 2021).

Inicialmente, las vacunas contra la DVB fueron orientadas a disminuir las presentaciones clínicas y la inmunosupresión producida por el virus, sin evaluar su eficacia en la prevención de la infección fetal (Moennig y Becher, 2018). Con el conocimiento del rol de los animales PI en la transmisión de la enfermedad, los esfuerzos se abocaron a evitar la infección fetal y con ello, la generación de nuevos animales PI. Sin embargo, se han reportado varios casos de transmisión transplacentaria del virus en hembras vacunadas y nacimiento de terneros PI (Van Campen et al., 2000; Zimmer et al., 2002). En el mercado internacional existe un amplio abanico de vacunas disponibles. Las vacunas vivas modificadas son eficaces en la producción de respuesta inmune celular y humoral, pero se han descrito efectos adversos por su uso, como la infección fetal por la cepa vacunal o cepas contaminantes del suero fetal bovino usado en su producción, sobre todo, las producidas a base de una cepa NCP (Newcomer et al., 2017). Por otro lado, han sido descritos casos de enfermedad de las mucosas en animales PI que han sido vacunados con vacunas vivas modificadas (Ridpath y Bolin, 1995; Zimmer et al., 2002). A diferencia de las anteriores, las vacunas a virus inactivado, son más seguras, pero deben aplicarse revacunaciones para producir buena inmunidad. Como beneficio, pueden utilizarse en cualquier etapa de la vida del animal, sin efectos adversos, aunque no está comprobado que confieran protección fetal. Algunos países, como Alemania, aplican un protocolo de vacunación combinado de dos pasos, donde se aplica primero una dosis de una vacuna inactivada y luego un “*booster*” con una vacuna

viva modificada y revacunaciones anuales con vacunas inactivadas (Wernike et al., 2017). El uso de vacunas vivas no está permitido en Argentina, por lo que el mercado local está compuesto principalmente por vacunas de los complejos Reproductivo y Respiratorio que contienen en su formulación VDVB inactivado, junto a otros microorganismos. Como alternativa a esto, recientemente, se ha lanzado al mercado una vacuna monovalente contra VDVB recombinante a subunidad que contiene la proteína E2 del virus unida a un anticuerpo de simple cadena dirigido a las células presentadoras de antígeno (APCH I-tE2) (Pecora et al., 2015).

A pesar del progreso en el desarrollo de vacunas y su uso masivo a nivel mundial, los esfuerzos por disminuir la prevalencia de la DVB utilizando el control no sistemático no han cumplido el objetivo. Esto puede deberse a la variabilidad del virus, ya que la inmunidad en los animales vacunados es importante contra las cepas homologas a la utilizada en la vacunación, pero menor frente a cepas antigénicamente distintas (Lindberg et al., 2006). Como consecuencia, nunca se ha reportado una estrategia de control satisfactoria utilizando como única medida la vacunación (Moennig y Becher, 2018).

1.6 Situación en el país y en el mundo

Muchos países como Noruega, Finlandia, Dinamarca y Suecia han erradicado la DVB o están cerca de hacerlo. Otros, como Suiza, Austria, Escocia y Alemania, están en fases avanzadas de los planes de erradicación, mientras que los Países Bajos, Irlanda, y varios estados de los Estados Unidos (Alabama, Oregon, Montana, entre otros) ya han comenzado sus programas de control (Van Campen, 2010; Wernike et al., 2017).

En países vecinos al nuestro, como Brasil, se ha detectado un 43% de rodeos positivos en un muestreo al azar de 300 establecimientos lecheros en el Estado de Rio Grande del Sur, aunque en rodeos más pequeños que los que encontramos en nuestra región (Almeida et al., 2013). En el sur de Chile, en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos, la prevalencia a nivel de rodeo y a nivel individual en un estudio aleatorio de 5000 sueros individuales fue estimada del 76% y 3,5%, respectivamente, (Alocilla y Monti, 2022). Similar situación se reportó en los departamentos de Tacuarembó, Rivera y Florida, en Uruguay, en un estudio de conveniencia realizado sobre 390 animales de 14 rodeos, donde la totalidad de los rodeos fue seropositivo, pero con prevalencias individuales del 76% (Maya et al., 2016).

Estudios previos realizados sobre terneros lactantes en las provincias de Santa Fe y Córdoba han detectado un porcentaje de seroprevalencia individual del 59,9% para VDVB y una dispersión en las explotaciones muestreadas del 97,2% (Carbonero et al., 2011). Por otro lado, un relevamiento realizado en 1998 a partir de muestras de suero de animales con problemas reproductivos en la provincia de Santa Fe indicó que en el 52,2% de los establecimientos

muestreados (n=184) hay reactores positivos (Castelli, 1998). Sin embargo, no se han realizado nuevos estudios que reflejen la realidad actual de la DVB en nuestra provincia.

En Argentina, en la mayoría de los casos, los métodos de control para VDVB se basan sólo en el empleo de vacunas desconociendo el estatus del rodeo frente a la infección viral, de igual manera casi no se realiza la detección de animales PI y ni se implementan medidas de bioseguridad, salvo algunas excepciones en establecimientos más ordenados. No existe ningún plan vigente a nivel nacional ni regional para la erradicación de la DVB, los pocos establecimientos que han saneado su rodeo, lo han hecho de forma voluntaria.

En nuestro país, donde los esfuerzos todavía están centrados en la erradicación de enfermedades zoonóticas como la brucelosis y tuberculosis, la implementación de programas obligatorios para sanear la DVB aún no son prioridad.

1.7 Pérdidas económicas asociadas a la DVB

La DVB produce importantes pérdidas productivas que son difíciles de cuantificar debido a la amplia variedad de manifestaciones que se pueden encontrar: muerte de animales, disminución en la ganancia de peso y en la producción de leche, muerte embrionaria, abortos, reposición de vientres, tratamientos veterinarios, aparición de enfermedades secundarias a la inmunosupresión producida por el virus (enfermedad respiratoria), entre otras (Laureyns, 2017). Las pérdidas varían de acuerdo al tipo de explotación, la situación epidemiológica del establecimiento, el manejo, el tamaño del rodeo, los cuadros que se presentan, el estado inmunitario del rodeo y la cepa viral involucrada (Richter et al., 2017).

En un estudio realizado en Nueva Zelanda, en rodeos lecheros, se estimó que las pérdidas debidas a la DVB, sin ningún tipo de estrategia de control, varían de 35,2 a 255 dólares neozelandeses anuales por animal (\$USD 21,7 a \$USD 157) de acuerdo al porcentaje de animales afectados en el rodeo, lo que lleva a un aproximado de 23,1 millones al año (14,2 millones de \$USD) de pérdidas en la producción lechera del país, sólo considerando la mortalidad en animales PI, disminución en la producción de leche, aumento en la presentación de mastitis clínicas, y disminución en la ganancia de peso. En este estudio no se tomaron en cuenta otros factores que incrementan las pérdidas asociadas al VDVB como las pérdidas reproductivas (mortalidad embrionaria, abortos, malformaciones), gastos veterinarios, tratamientos, enfermedad respiratoria e inmunosupresión. Por su parte, los costos de las estrategias de control, varían de acuerdo a la estrategia elegida, o a la combinación de ellas. La vacunación de un rodeo promedio de 322 animales, tiene un costo de 5.313 dólares neozelandeses (\$USD 3.273) el primer año y un total de 21.827 (\$USD 13.446) por 10 años. La estrategia de testeo y sacrificio de PI tiene un costo de 5.149 dólares neozelandeses anuales

(\$USD 3.172) y 6.215 por 10 años (\$USD 3.828). Finalmente, el incremento de las medidas de bioseguridad, tienen un costo anual de 8.720 dólares neozelandeses (\$USD 5.372) y 19.218 por 10 años (\$USD 11.839), incluyendo el testeo de animales y el aseguramiento del perímetro (Reichel et al., 2008).

En Argentina se realizó un estudio similar de un brote de DVB en un rodeo de cría de la Provincia de Buenos Aires en 2015, con 528 vientres, donde se estimaron pérdidas totales por infección con el virus de \$USD 24.631, incluidos los costos de vacunación (\$USD 687), pérdidas reproductivas (\$USD 9.697), mortalidad de animales de recría (\$USD 10.147) y el costo de la implementación del plan de saneamiento (\$USD 3.434) (Odeón et al., 2015). En este estudio, se calculó que las pérdidas por abortos y muerte perinatal de 22 hembras fueron de \$USD 3.150 por reposición de vientres abortados y los ingresos no percibidos por terneros al destete fueron de \$USD 6.547 Cabe destacar que este estudio sólo incluyó las pérdidas reproductivas y la mortalidad de animales de recría, sin tener en cuenta otros factores que pueden aumentar las pérdidas económicas. Por otro lado, las pérdidas económicas en rodeos de carne, suelen ser aproximadamente 20% menores que en rodeos de leche, con un promedio de \$USD 199,5/vaca para rodeos lecheros y de \$USD 174,6/vaca para rodeos de carne, de acuerdo a una revisión realizada a partir de 44 publicaciones científicas (Richter et al., 2017).

Otra revisión realizada a partir de 31 publicaciones científicas concluyó que el impacto económico de la DVB varía desde \$USD 0 a \$USD 695 por vaca por año, con un promedio de \$USD 58,5. En rodeos con infección endémica, el impacto sería de \$USD 8,13 a \$USD 109,5 por vaca por año y en rodeos susceptibles, los brotes tendrían pérdidas de \$USD 36 a \$USD 2.983 (Yarnall y Thrusfield, 2017).

Si bien es difícil realizar una estimación de pérdidas económicas debido a los múltiples factores que intervienen en la enfermedad, la bibliografía existente demuestra, en todos los casos, que el costo de realizar el control y saneamiento de la DVB en los rodeos y a nivel nacional es superado ampliamente por las pérdidas económicas que se producen si éste no se realiza. Por ejemplo, el costo del programa de erradicación de DVB de Dinamarca fue estimado en \$USD 9 millones anuales los primeros tres años, que posteriormente se redujeron a \$USD 3,5 millones anuales. Al finalizar el programa, los beneficios anuales de la erradicación de la DVB fueron casi de \$USD 20 millones, por lo cual, el programa resultó económicamente conveniente (Houe, 2003).

Lamentablemente, no se cuenta con estudios actualizados sobre las pérdidas económicas en Argentina, pero serían de gran relevancia a la hora de tomar decisiones para el control de la enfermedad.

2.OBJETIVOS

2. Objetivos

Objetivo General

Diseñar y ejecutar estrategias sustentables y económicamente viables que permitan conocer la situación del VDVB en tambos de la provincia de Santa Fe y faciliten su diagnóstico y control.

Objetivos Específicos

1. Estimar la proporción de rodeos infectados con el VDVB en establecimientos productores de leche de la provincia de Santa Fe.

1.1 Desarrollar un ELISA para detección de anticuerpos anti VDVB en muestras de suero y leche.

1.2 Realizar muestreos de BTM (*bulk tank milk*) en establecimientos seleccionados dentro de la provincia de Santa Fe y determinar la presencia de anticuerpos anti VDVB mediante un test de ELISA.

2. Desarrollar una qPCR y muestreo con DBT (*dried blood test*) para la detección del ARN del VDVB para monitorear establecimientos de la región.

2.1 Adaptar una técnica de qPCR para la detección de VDVB en muestras de suero y semen.

2.2 Desarrollar un método de muestreo y procesamiento DBT.

2.3 Monitorear la DVB en establecimientos de producción de leche de la región en el lapso de 3 años.

2.4 Caracterizar filogenéticamente las cepas de VDVB obtenidas en la provincia de Santa Fe.

3. HIPÓTESIS

3. Hipótesis

Las técnicas complementarias de laboratorio (ELISA, qPCR y DBT) desarrolladas serán herramientas útiles y económicamente viables para aplicar en planes de saneamiento y control de la DVB en establecimientos lecheros y contribuirán también a obtener información sobre la presentación de la DVB en la provincia de Santa Fe.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. Materiales y métodos

4.1.1 Desarrollar un ELISA para detección de anticuerpos anti VDVB en muestras de suero y leche.

4.1.1.1 Obtención de la proteína recombinante

La proteína no estructural NS3 del VDVB posee un peso de 80 kDa y es conservada en los distintos genotipos del VDVB. Está conformada por dos dominios: uno serin-proteasa (tercio N-terminal) y otro helicasa (en los dos tercios C-terminal). El extremo N-terminal es hidrofóbico, lo que provoca que la proteína quede retenida en cuerpos de inclusión cuando se expresa en bacterias, por lo que se clonó la proteína NS3 con su extremo N-terminal truncado, generando una proteína de 45kDa. El gen correspondiente a la proteína fue clonado en el vector pET-28-a(+) con un tag de histidinas para su posterior purificación (Figura 3) utilizando como sistema de expresión bacterias de *E.coli*.

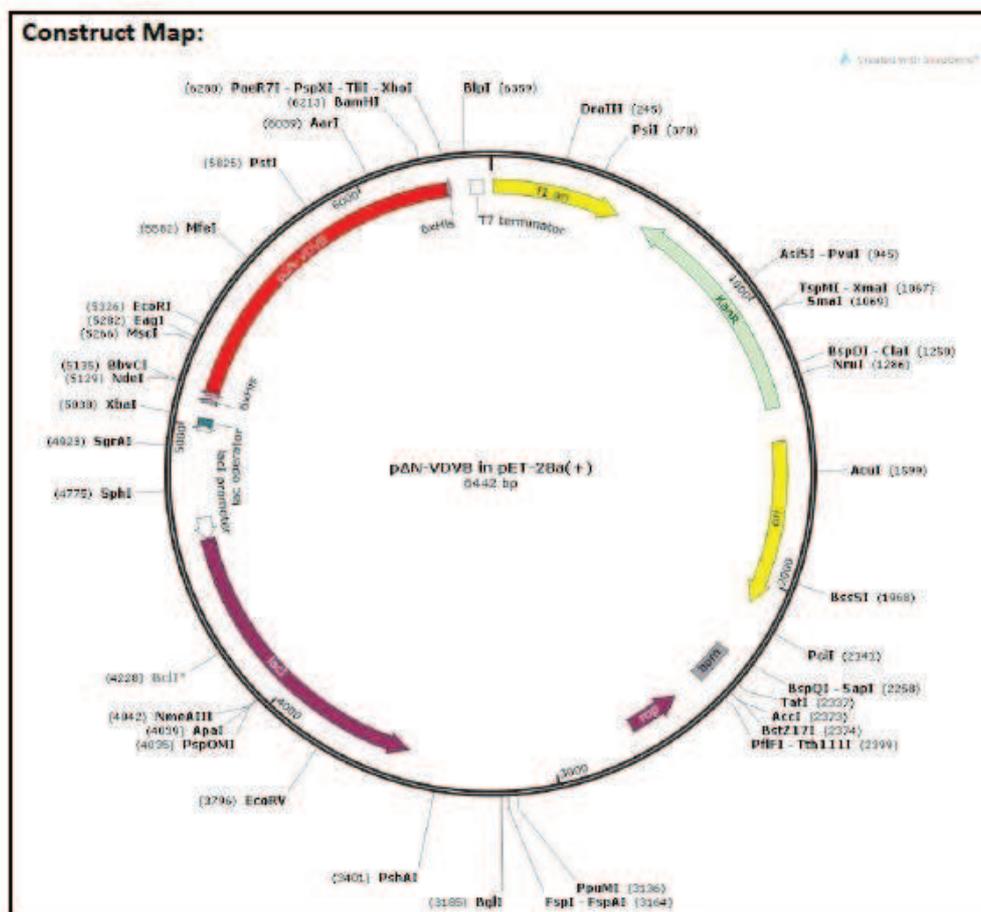


Figura 3. Construcción del vector de clonación pET-28a(+) con el gen de la proteína NS3 truncada. En rojo se observa el sector donde se insertó el gen.

4.1.1.2 Generación de paneles de sueros y leches de tanque

Se recolectaron en total 665 sueros individuales cedidos por un laboratorio de diagnóstico, provenientes de animales de un establecimiento de la región, que fueron procesados por un kit de ELISA comercial (IDEXX, Cat. P00645-5) para su clasificación en positivos (altos y bajos) y negativos. De la misma manera, se recolectaron 282 muestras de leche de tanque (positivas y negativas) de establecimientos de la provincia de Santa Fe, que remiten su producción a una industria láctea de la región, que fueron procesadas con el kit de ELISA comercial. Los sueros y las leches de tanque positivos y negativos permitirán estandarizar el ELISA y su comparación con otras técnicas de detección de anticuerpos anti NS3 del VDVB (sensibilidad y especificidad).

4.1.1.3 Desarrollo del ELISA

Si bien el desarrollo del ELISA se encuentra aún en proceso, se han realizado los siguientes avances:

Selección del formato del ELISA

El ELISA desarrollado es de tipo indirecto, es decir, la placa se recubre con el antígeno de captura específico (proteína NS3) que se une e inmoviliza al anticuerpo específico anti-NS3 potencialmente contenido en la muestra problema. En caso de formarse un complejo antígeno-anticuerpo, se detectará utilizando un segundo anticuerpo IgG anti-bovino conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, cat. 101-035-003).

Selección del tipo de placa

A fin de verificar la potencial existencia de diferencias entre los distintos tipos de placa en el desarrollo del ELISA, se testearon placas con high y medium binding de fondo plano y placas con fondo en "U".

Concentraciones de proteína

Se testearon diversas concentraciones de la proteína NS3 diluida en buffer de unión de carbonato-bicarbonato: 1000 ng/well, 500 ng/well, 250 ng/well, 125 ng/well, 62,5 ng/well.

Diluciones de los sueros positivos y negativos

Para la puesta a punto de la técnica se utilizaron sueros conocidos positivos y negativos frente a anticuerpos anti NS3 (testeados previamente con un ELISA comercial). Éstos fueron diluidos en concentraciones de: 1/10; 1/20; 1/40; 1/50; 1/60; 1/80; 1/90; 1/120; 1/160; 1/250.

Soluciones para dilución de sueros y conjugado

Se evaluaron distintas soluciones para la dilución de los sueros y el conjugado: PBS Tween 20 (0,05%); PBS Tween 20 (0,05%) + 2% leche en polvo descremada; PBS Tween 20 (0,05%) + 5% suero normal equino (SNE); PBS Tween 20 (0,05%) + 1% SNE.

Evaluación de distintos tipos de bloqueo:

Las soluciones de bloqueo ensayadas fueron: PBS Tween 20 + 2% leche descremada en polvo; PBS Tween 20 + 2% leche descremada en polvo + 5% SNE; PBS Tween 20 + 5% SNE; PBS Tween 20 + 10% SNE.

Por otra parte, se evaluaron distintos tiempos y temperaturas de bloqueo: 1 hora, 2 horas y toda la noche a 37°C y a TA.

Además, se utilizaron dos volúmenes de bloqueo: 50 µL y 300 µL.

Diluciones del conjugado

El conjugado anti-bovino peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Cat. 101-035-008) fue diluido en 3 concentraciones: 1/2500, 1/5000, 1/20000.

Condiciones de los lavados

Entre cada paso de la técnica se realizaron lavados, evaluando la diferencia entre 3 y 4 lavados con 300 µL de PBS y PBS + Tween 20 (0,05%), que fueron realizados de forma manual con micropipetas multicanal.

Controles

Controles (blanco) sin suero: se tomó como rango aceptable una densidad óptica (DO) entre 0,05 a 0,2, que indica el *background*.

Sustrato de la enzima, solución de frenado y lectura

Como sustrato de la enzima se utilizaron 100 µL de TMB (Thermo Scientific Cat. 34021), como solución de frenado se utilizó ácido sulfúrico 2 M (100 µL) y la lectura se realizó en equipo BioTeK Elx808 *plate reader* a 450 nm.

4.1.2 Realizar muestreos de BTM (*bulk tank milk*) en establecimientos lecheros de la provincia de Santa Fe y determinar la presencia de anticuerpos anti VDVB mediante un test de ELISA

La principal cuenca lechera de la provincia de Santa Fe se encuentra en el territorio centro-oeste de la provincia. Ésta forma parte, junto con el este de la provincia de Córdoba, de la mayor cuenca lechera de Argentina. Según datos de la Bolsa de Comercio de Rosario, en 2018, el 81% de las vacas lecheras de la provincia de Santa Fe se encontraba en 4 departamentos: Castellanos, Las Colonias, San Cristóbal y San Martín, que, sumando sus existencias, representaban el 33,4% del ganado bovino de leche del país (Fuente: Bolsa de Comercio de Rosario. 2018. Descargado de: <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/sector-lacteo>). Datos más actuales, indican que Santa Fe es la provincia con mayor número de establecimientos lecheros (33,4) y posee el mayor porcentaje de vacas de tambo del país (31,9 %), con una distribución a nivel nacional del 9,40% para el departamento Castellanos, 7,25% para Las Colonias, 6,79% en San Cristóbal y 2,57% en San Martín (Figura 4) (Fuente: SENASA, 2021. Caracterización de tambos bovinos).

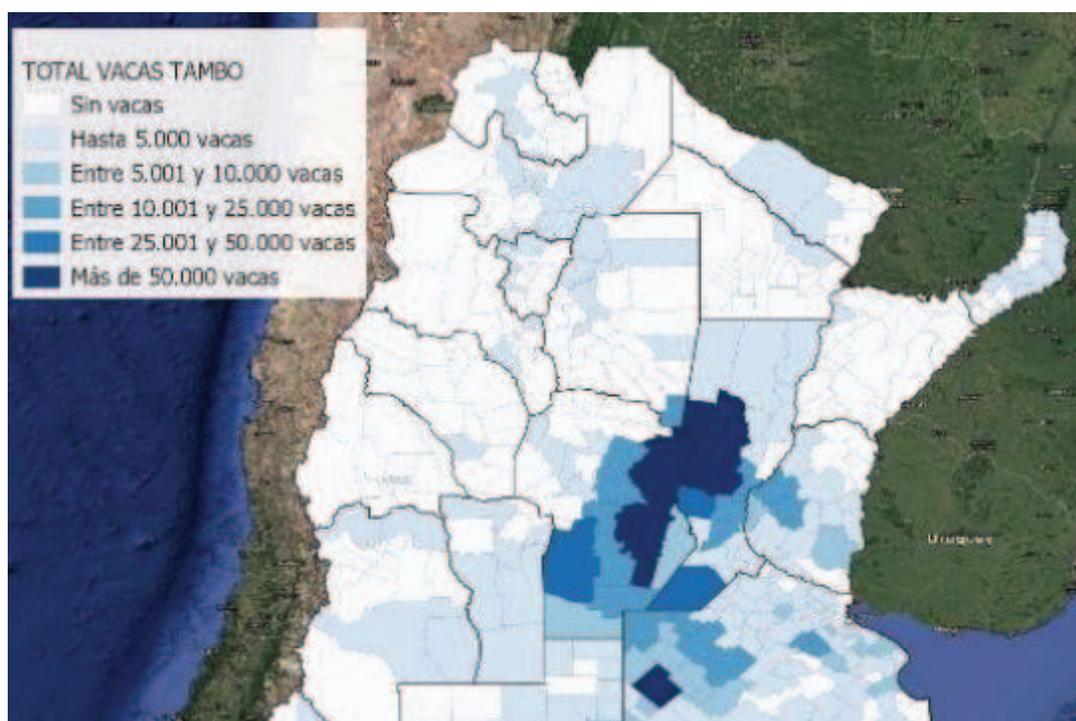


Figura 4. Existencias de ganado lechero en la Provincia de Santa Fe. Distribución de establecimientos lecheros en la provincia de Santa Fe. La intensidad del color refleja el número de animales por tambo. Fuente: SENASA, 2021. Caracterización de tambos bovinos. Diciembre 2021. Descargado de: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/87-caracterizacion_tambos_bovinos_diciembre_2021.pdf

En un muestreo de conveniencia, se obtuvieron muestras de leche de tanque (BTM o *bulk tank milk*) de 262 establecimientos ubicados en la cuenca lechera de la provincia de Santa Fe remitentes a una industria láctea. Los establecimientos incluidos en el muestreo estaban situados en los departamentos Belgrano (n=4), Castellanos (n=83), La Capital (n=7), Las Colonias (n=61), San Cristóbal (n=74), San Jerónimo (n=3) y San Martín (n=30).

Para ello, se recolectaron muestras BTM en frascos de 50 mL que se mantuvieron refrigeradas entre 4 y 7°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 2.000 rpm, para la separación de las fases. Se tomó una alícuota de la fase de suero de leche (central) que fue testeada con un kit comercial de ELISA de competición (INGEZIM PESTIVIRUS Compac, cat. 12.BVD.K3), según el protocolo del fabricante, para la detección de anticuerpos anti-NS3 del VDVB. Brevemente, se colocaron alícuotas de 100 µL de suero de leche, controles positivos y negativos (provistos por el kit) en la placa, que se incubó 45 minutos a 37°C, seguido de 3 lavados con la solución de lavado provista en el kit. Posteriormente, se colocaron 100 µL del conjugado, con una incubación de 30 minutos a 37°C, seguida de 5 lavados. Luego se colocaron 100 µL de sustrato y se dejó la placa 10 minutos a temperatura ambiente (TA) en oscuridad, para finalmente agregar 100 µL de solución de frenado con el objetivo de frenar la reacción.

La absorbancia fue medida mediante un espectrofotómetro con una longitud de onda de 450 nm (Biotek). El test se consideró válido cuando la absorbancia del control positivo fue mayor a 0,8 y la del control negativo fue menor a 0,24. Para la interpretación de los resultados, se calculó la relación DO muestra/DO control positivo; si esa relación era mayor a 0,3, la muestra se consideró positiva; si era menor o igual a 0,3, la muestra se consideró negativa. Si bien se desconoce el historial de vacunación de los rodeos, el kit de ELISA utilizado detecta anticuerpos anti-NS3 (proteína no estructural del VDVB) producidos por infección natural.

Según los fabricantes del kit de ELISA, la sensibilidad y especificidad de la técnica son de 96,9% y 97,4%, respectivamente, en comparación con la seroneutralización. Estudios de correlación entre las prevalencias individuales y en muestras BTM de rodeos lecheros, indican que los rodeos con prevalencias $\geq 10\%$ dan positivo a estos tests de ELISA en muestras BTM, lo que resulta muy útil a la hora de monitorear el status infeccioso del rodeo (Beaudeau et al., 2001).

4.2.1 RT-qPCR para la detección de VDVB en muestras de suero y semen

4.2.1.1 Especímenes

Cepas virales:

El stock viral utilizado para las distintas determinaciones consistió en la cepa vs253 del VDVB-2 (*Pestivirus B*) cedida por el Dr. Flores (Universidad Federal de Santa María, Brasil) (Pecora et al., 2015), cultivado y titulado en células MDBK con un título de $5,62 \times 10^6$ TCID₅₀/mL.

Además, se utilizaron distintas cepas del VDVB cultivados en células MDBK disponibles en el Ceparío del Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT, CICVyA) para verificar la detección de todas las variedades de *Pestivirus* bovinos que se encuentran en nuestro país. Éstas incluyeron 13 cepas de VDVB-1 (*Pestivirus A*): 4 del sub-genotipo a (Singer; MF120553; 88625; 71267) y 9 del sub-genotipo b (63588; 90611; MF120552; 59473; 83532; 73611; MF120594; 78256; 25366), 4 cepas de VDVB-2 (*Pestivirus B*): 76/08; vs253; MF120585; MF120586 y 5 cepas de VDVB-3 (*Pestivirus H o HoBi-like*): LV210185K/13; MK017821; MH992643; MZ189735; MZ189734.

Por otro lado, se utilizaron cepas de agentes microbianos no relacionados al VDVB de importancia en la salud bovina para comprobar la especificidad de la RT-qPCR, que incluyeron: *Virus Respiratorio Sincicial Bovino* (VRSB), *Parainfluenza-3* (PI-3), *Herpesvirus Bovino-5* (HVB-5), *Herpesvirus Bovino-1* (HVB-1), *Virus de la Lengua Azul* (VLA), *Mycoplasma bovis* y *Rotavirus Bovino A* (RVA), cepas de referencia obtenidas del ceparío del IVIT, CICVyA.

Plásmido:

A fin de realizar la cuantificación absoluta del número de copias presentes en cada muestra se insertó en un plásmido el producto de 200 pares de bases (pb) que contiene el 5'UTR del genotipo 1b (cepa 1b 25366) del VDVB (amplificado mediante RT-PCR). Los productos se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% en presencia de un marcador de masa molecular (Biodynamics, cat. B040-50) y se cortaron las bandas con un bisturí. Se purificó el ADN utilizando el kit comercial Wizard DNA clean up system (Promega, cat. A7280).

Para realizar el clonado se utilizó el vector pGem-T Easy (Promega, cat. A1360) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la transformación se utilizaron bacterias cepa DH5- α de *E. coli*, sensibilizadas (células competentes), las cuales fueron transformadas con el producto de ligación. Para la ligación, se utilizaron 5 μ L de agua, 1 μ L de ligasa, 1 μ L del pGem, 2 μ L del inserto de interés y 1 μ L de buffer, con un volumen final de 10 μ L. La transformación se realizó mediante el método de *shock* térmico, siguiendo metodología estándar de biología molecular (Pope y Kent, 1996): se colocaron 100 μ L de bacterias y 2 μ L del producto de ligación en un tubo de 15

mL, se incubaron en hielo por 30 minutos. Posteriormente, se colocaron en baño termostático a 42°C por 2 minutos y nuevamente en hielo por otros 2 minutos. Se agregaron 900 µL de medio LB 1X, mezclando suavemente y se incubaron en agitación a 37°C por una hora. Luego se centrifugaron y se descartaron 800 µL de sobrenadante, resuspendiendo el pellet en el mismo medio. Finalmente, se plaquearon 20 µL y 180 µL en dos placas con medio LB y se incubaron toda la noche (ON) a 37°C. Luego de seleccionar las colonias positivas (color blanco), éstas se multiplicaron ON en 3 mL de medio LB con ampicilina a 37°C en agitación en *shaker* a 200 rpm. El plásmido se purificó mediante un kit comercial Wizard Plus SV Minipreps (Promega, cat. A1330), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para corroborar que el plásmido posea el inserto se realizó una digestión con enzimas de restricción EcoR1 (que cortan en los sitios de la siguiente secuencia: 5´GAATTC y 3´CTTAAG). El resultado de la digestión se visualizó en un gel de agarosa al 2% en presencia de un marcador de masa molecular (PBL, cat. MA1201).

Luego de confirmar la presencia del inserto en el plásmido, se realizó una amplificación en 100 ml de LB con el antibiótico correspondiente a 37°C en agitación ON; posteriormente, estos cultivos se utilizaron para realizar midipreparaciones de ADN plasmídico empleando el kit comercial TIANpure Midi Plasmid Kit (TIANGEN, cat. DP107) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El producto de purificación se cuantificó mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) y con el valor de la masa de ADN se calculó la cantidad de copias presentes en el templado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de copias} = (\text{Masa} * 6.022 * 10^{23}) / (\text{N}^{\circ} \text{ pb} * 1 * 10^9).$$

La cantidad de ADN cuantificado por espectrofotometría fue 8,7 ng/µL y el tamaño del fragmento fue 3.215 bp, dando un número de copias del plásmido de $2,5 * 10^9$.

Muestras de suero y semen

Se trabajó con muestras de suero y semen confirmadas negativas a VDVB mediante una RT-PCR de punto final, que luego fueron contaminadas con una concentración conocida de virus stock para el desarrollo de la RT-qPCR.

Para las determinaciones en las que se utilizó suero, se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante y se enviaron al laboratorio a 4°C. El suero fue separado inmediatamente mediante centrifugación a 2.000 rpm por 5 minutos y dispuesto en tubos tipo eppendorf de 1,5 mL estériles. Se almacenaron refrigerados a 4°C hasta su procesamiento. Cuando el procesamiento no fue inmediato, se almacenaron a -80°C y se descongelaron a TA previo a su utilización.

En los casos en los que se procesaron los sueros en *pools*, se tomaron alícuotas de cada muestra (el volumen de cada suero a utilizar se calculó según la cantidad de sueros por *pool*, con

un volumen final por *pool* de 200 μ L) y se mezclaron en un tubo tipo eppendorf de 1,5 mL. Los *pools* fueron conformados por sueros de 10, 20, 30, 40 y 50 animales.

Para las determinaciones realizadas a partir de semen, se utilizaron pajuelas de 250 μ L de semen diluido que fueron remitidas al laboratorio en termos de nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. El descongelamiento se produjo a temperatura ambiente.

Para contaminar las muestras de suero y semen, se calculó la cantidad necesaria de virus a adicionar para que su concentración fuera similar a la de un animal PI. Según diversos autores, el título viral en muestras de suero y semen en animales PI es $\geq 1 \times 10^4$ DICT_{50/mL} (Brock et al., 1998; Meyling y Mikél Jensen, 1988). Para proceder a la contaminación con virus stock, se agregó 10 μ L del cultivo de virus a 190 μ L de suero o semen para que el volumen de extracción fuera 200 μ L.

Muestras clínicas

Veintiocho muestras clínicas recolectadas de animales infectados naturalmente que fueron confirmadas positivas mediante aislamiento viral en cultivos celulares y posteriormente por inmunofluorescencia directa, fueron testeadas para asegurar la detección del ARN viral mediante el ensayo. Las muestras analizadas fueron: 4 de intestino, 7 de fetos, 3 hisopados nasales, un hisopado ocular, 2 de esófago, una de pulmón, dos de bazo, y 8 de sangre (provistas por el Laboratorio Azul y el Servicio Especializado de Diagnóstico Veterinario de INTA Balcarce, aisladas de la provincia de Buenos Aires).

4.2.1.2 Estandarización de la RT-qPCR

Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó con kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, cat. 11796828001) según protocolo del fabricante, para lo cual se utilizaron 200 μ L de suero, semen o stock viral.

Se utilizaron como control positivo 200 μ L de VDVB-2 cepa vs253 y un control negativo (NEC "*negative extraction control*") consistente en el buffer de elución incluido en el kit. El ARN obtenido fue inmediatamente trasladado a ultrafreezer o mantenido en hielo si su utilización fue inmediata. Todo el procedimiento fue realizado con material plástico estéril y puntas de micropipetas con filtro.

Reacción de retro-transcripción y qPCR

Las reacciones de retro-transcripción y qPCR fueron llevadas a cabo simultáneamente usando el kit iTaq Universal SYBR Green One-Step Kit (Bio-Rad, cat. 172-5150). Para ello, se

preparó una mezcla de un volumen final de 10 µL con 5 µL de iTaq Universal SYBR Green *reaction mix*, 0,125 µL de iScript transcriptasa reversa, 0,25 µL de cada *primer* (Genbiotech), 2,625 µL de agua libre de nucleasas (Byodinamics) y 2 µL del ARN extraído.

El programa de ciclado consistió en: 10 minutos a 50°C para la reacción de retro-transcripción; 1 minuto a 95°C para la activación de la polimerasa y la desnaturalización del ADN, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C, concluyendo con un incremento de 0,5°C desde 65 a 95°C cada 2 segundos, usando el equipo StepOne (Applied Biosystems).

Controles

En cada reacción se incluyeron controles positivos (plásmido, virus stock), controles negativos (NEC) y controles internos de genes constitutivos bovinos para monitorear la extracción de ácidos nucleicos y la presencia de inhibidores de PCR. Esto último fue realizado utilizando *primers* específicos que amplifican un fragmento del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa bovina (GAPDH) (Robinson et al., 2007).

Selección de *primers*

Los *primers* seleccionados para el desarrollo de la técnica fueron descritos por Monteiro (Monteiro et al., 2019) (Tabla 1) y amplifican una secuencia de 201 pb del sector 5'-UTR del genoma del VDVB.

Tabla 1. *Primers* utilizados en la RT-qPCR

<i>Primer</i>	Secuencia
189 (<i>Forward</i>)	5`AGTCGTCAR ^{A,G} TGGTTCGAC 3`
389 (<i>Reverse</i>)	5`TCCATGTGCCATGTACA 3`

Referencias. En la columna de la derecha se indica el nombre de cada *primer*. A la izquierda figura la secuencia de nucleótidos correspondiente.

Los *primers* utilizados alinean con la cepa de referencia 1-NADL (número de acceso a GenBank M31182) entre las posiciones 189 y 389 de la secuencia completa y se verificó mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) que alinearan con las secuencias disponibles en GenBank de los genotipos del VDVB presentes en Argentina.

Ajuste de la concentración de *primers* y rango lineal de detección del plásmido

Para establecer la concentración de *primers* más eficiente, se testearon diluciones en base 10 del plásmido en diversas concentraciones de *primers*: 390 nM, 420 nM, 450 nM, 470 nM, 525 nM, 535 nM y 540 nM. La eficiencia de los *primers* fue confirmada mediante la fórmula:

$$\text{Eficiencia (\%)} = -1 + 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

Donde un valor cercano a -3,32 indica 100% de eficiencia. Esto aseguró que los productos de PCR fueron amplificados a una velocidad eficiente y los experimentos fueron comparables entre ellos.

Tres réplicas de las diluciones en base 10 del plásmido, desde 10^9 a 10^0 copias, también fueron utilizadas para realizar la curva estándar, dando el rango lineal de detección del plásmido y su límite de detección. El rango lineal de la qPCR fue establecido mediante una curva estándar con diluciones en base 10 del plásmido (desde 2,5 a 2.500.000.000 copias).

Sensibilidad analítica

El límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés "*limit of detection*") se calculó para el plásmido, stock viral, suero y semen contaminado. Para esto, se testearon diluciones en base 10, de 10^9 a 10^0 copias del plásmido (3 réplicas) y desde 10^5 a 10^0 partículas virales para el virus stock, semen y suero contaminado (12 réplicas). Por otro lado, con el objetivo de determinar la eficiencia de la RT-qPCR en la detección de positivos en *pooles* de muestras, se conformaron mezclas de suero con 10, 20, 30, 40 y 50 muestras individuales, incluyendo solo un suero positivo en cada *pool*.

Ensayos de precisión

Se realizaron estudios de repetitividad sobre el plásmido y el stock viral y se compararon los valores de los CT (*cycle threshold*) en los distintos ensayos con el objetivo de asegurar la precisión en la detección del segmento 5'UTR. Los valores de CT de 25 repeticiones del virus stock y 10 repeticiones del plásmido (procesadas por triplicado) fueron registrados y se calculó el promedio, desvío estándar, coeficiente de variación ponderado (CVpp) y error aleatorio máximo permitido (Cva%).

Especificidad analítica

Se utilizaron cepas del VRSB, PI-3, HVB-5, HVB-1, VLA, *Mycoplasma bovis* y RVA para evaluar la especificidad de la técnica. Además, se incluyeron cepas de Pestivirus A, B y H (VDVB 1, 2 y 3) presentes en Argentina para asegurar la detección y amplificación del fragmento de interés en todas ellas.

Ensayos inter-laboratorio

Se enviaron alícuotas del plásmido y los reactivos e instructivos necesarios para la realización de la prueba a tres técnicos entrenados de diferentes laboratorios para la realización de la qPCR. Dos de ellos ubicados en el Instituto IVIT-CICVyA y otro en un laboratorio de diagnóstico veterinario privado. Los mencionados laboratorios cuentan con áreas separadas

para la preparación de mezclas de PCR y siembra de muestras, además de equipamiento disponible: termocicladores iQ5 (Bio-Rad), ABI7500 (Applied Biosystems) y MyGo (IT-IS Life Science).

Análisis de los resultados

Los resultados fueron registrados y analizados con el software StepOne versión 2.3. De cada corrida de qPCR se analizaron las curvas de amplificación, para conocer el ciclo que supera el umbral y las curvas de *melting*, para verificar la especificidad de la amplificación.

4.2.2 Muestreo y procesamiento DBT (*dried blood test*)

4.2.2.1 Selección de papeles, eluyentes y matrices

Con el fin de determinar las mejores opciones de papeles y eluyentes en las distintas matrices, se contaminaron muestras de sangre, semen y suero libres de *Pestivirus* con la cepa de virus stock, de manera que cada muestra a evaluar tuviera un título de 1×10^4 DICT₅₀. Se sembraron gotas de 50 μ L de cada matriz en distintos papeles y se dejaron secar por 4 horas a TA en un lugar fresco y seco. Para esta prueba preliminar, se compararon cuatro papeles distintos: S&S 903 collection card (Whatman, Cat. A01776), papel cromatográfico (Whatman, GE Healthcare, Cat. 3030-335), Tarjetas FTA Whatman (GE Healthcare, Cat. WHAWB120305) y Gen saver (Ahlstrom Munksjo, Cat. 7300692). Concurrido el tiempo de secado, se cortaron 4 discos con sacabocado de 5 mm de diámetro de cada gota sembrada en los distintos papeles, los cuales fueron dispuestos en tubos eppendorf de 1,5 mL con 220 μ L de eluyente. Los eluyentes evaluados fueron: FTA-Purification Reagent (Whatman, Cat. WB120204), Buffer TE (Invitrogen, Cat. 12090015), Minimal Essential Medium (MEM) (Gibco, Cat. 12492013), H₂O libre de nucleasas (Biodynamis, Cat. B010-50) y TRIzol (Invitrogen, Cat. 15596026) para cada tipo de papel y de muestra. La elución se realizó ON a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se procedió con la extracción de ARN y RT-qPCR descrita anteriormente.

En base a los resultados obtenidos en la prueba preliminar (Anexo I), se seleccionaron dos tipos de papeles de filtro para realizar los experimentos subsecuentes: tarjetas FTA (Whatman, Cat. WHAWB120305) y papel cromatográfico de celulosa de 3mm de espesor (GE Healthcare Whatman, Cat. 3030-335). Ya que las tarjetas FTA están especialmente diseñadas para la conservación de ácidos nucleicos por largos periodos de tiempo, se utilizaron con fines de conservación de ARN; en cambio, el papel cromatográfico, por su bajo costo, se utilizó con el objetivo de diagnóstico rápido de DVB en casos de sospecha de enfermedad. Esto último, teniendo en cuenta que en ocasiones resulta difícil remitir una muestra fresca (sangre o suero)

tomada a campo en establecimientos lejanos a los laboratorios de diagnóstico y que esa muestra llegue a destino dentro de las 24 hs.

Dada la conveniencia de muestreo a campo, se decidió utilizar sangre -en vez de suero- como matriz para los experimentos, ya que sólo se necesita una pequeña cantidad que puede ser sembrada directamente a campo y no es necesario centrifugarla para obtener suero, lo que representaría un inconveniente para el veterinario que remite la muestra. De la misma forma, también se seleccionó como matriz las pajuelas de semen, ya que el uso de esta metodología representaría un gran avance en la logística de envío de muestras. Esto último hace referencia a la necesidad de enviar muestras de semen en pajuelas en termos de nitrógeno líquido, lo que implica mayores gastos e inconvenientes de logística para el envío.

Así mismo, se decidió utilizar como eluyente al MEM en ambos tipos de matrices (sangre y semen) dado su bajo costo en relación al resto de los eluyentes y buenos porcentajes de recuperación en general.

Control de papeles utilizados

Con la finalidad de comprobar que los papeles no contuvieran material genético que pudiera interferir con los resultados de la prueba, se evaluaron ambos tipos de papeles a utilizar (papel cromatográfico y tarjetas FTA), sin sembrar ningún tipo de muestra, mediante RT-qPCR.

Evaluación del método de elución

Se colocaron 4 discos de cada gota de sangre y semen sembrados en papel cromatográfico en 220 µL de MEM y se llevaron a agitación en *shaker* durante 30 minutos y ON con el objetivo de evaluar las mejores condiciones de elución por triplicado.

4.2.2.2 Sangre sembrada en papeles

Porcentaje de recuperación de ARN respecto a la muestra fresca

Se comparó la recuperación de ARN de la muestra de sangre contaminada sembrada en papel cromatográfico y la misma muestra de forma fresca (sin sembrar) mediante la RT-qPCR descrita anteriormente por triplicado.

Límite de detección

A continuación, se procedió a contaminar la muestra de sangre con distintas concentraciones de virus, por lo cual, se sembraron gotas contaminadas en papel cromatográfico con 1.000, 5.000, 10.000, 20.000, 40.000 y 80.000 copias virales (12 réplicas) con el objetivo de determinar el LOD en papeles.

Almacenamiento y recuperación de ARN viral en distintas condiciones

Con el fin de verificar si el papel cromatográfico permite la conservación del ARN viral por largos periodos de tiempo, se diseñó un experimento en el cual se sembraron gotas de sangre contaminada con 50.000 copias de virus (para asemejar la carga viral de un animal PI), que fueron almacenadas a distintas temperaturas (TA, 4°C, -20°C y -70°C) por 1 y 7 días, y 6, 12 y 18 meses.

Al cumplirse cada periodo de tiempo, se cortaron 4 discos de cada gota con sacabocados, que fueron eluidos en 220 µL de MEM por 30 minutos en agitación. Posteriormente se realizó la RT-qPCR descrita anteriormente para detección de ARN de VDVB. Por cada condición, se realizaron 5 repeticiones.

Al mismo tiempo, se realizó el experimento en tarjetas FTA, especialmente formulado para conservar ARN por las sustancias químicas que incluye. De la misma forma, se sembraron 5 gotas de sangre contaminada por cada condición (TA, 4°C, -20°C, -70°C) por 12 y 18 meses, con el objetivo de verificar si el ARN del VDVB puede conservarse por largos periodos de tiempo y definir cuál es la mejor temperatura de almacenamiento.

Las gotas sembradas en papeles y almacenadas a distintas temperaturas, se mantuvieron dentro de bolsas *zipper*, conteniendo desecantes para evitar el daño por humedad.

Almacenamiento y recuperación de ARN viral en muestras clínicas

Se tomaron muestras de sangre de dos animales infectados naturalmente, positivos a VDVB por RT-PCR y se sembraron gotas de 50 µL en papel cromatográfico. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante cuatro horas y posteriormente, se mantuvieron refrigeradas a 4°C durante seis y doce y dieciocho meses. Cumplido ese periodo de tiempo, se intentó recuperar el ARN de las gotas sembradas en las tarjetas, mediante la elución con 220 µL de MEM.

Prevención de la contaminación cruzada

Para evitar contaminación cruzada entre muestras sembradas en papeles, se siguió la metodología descrita por Sarangi et al. (2018). Brevemente, el sacabocados fue descontaminado entre muestras mediante la inmersión en alcohol isopropílico por un minuto. Luego, fue secado con papel absorbente y se realizaron 5 cortes en un papel cromatográfico nuevo y limpio (Sarangi et al., 2018).

4.2.2.3 Semen sembrado en papeles

Porcentaje de recuperación de ARN respecto a la muestra fresca

Con el fin de comparar la recuperación de ARN de la muestra contaminada sembrada en papel y la misma muestra de forma fresca (sin sembrar en papel), se contaminaron pajuelas de semen con virus stock, de manera que en una gota de 50 μ L de semen hubiera 50.000 copias de ARN.

Se sembraron gotas de 50 μ L de semen contaminado en papel cromatográfico, se dejaron secar a temperatura ambiente por 4 hs y luego se cortaron 4 discos de 5 mm de diámetro con sacabocados de cada gota para proceder a la elución con 220 μ L de MEM y al procesamiento mediante la RT-qPCR descrita.

Sensibilidad en papeles de filtro

A continuación, se procedió a contaminar la muestra de semen con distintas concentraciones de virus (12 réplicas), por lo cual, se sembraron gotas contaminadas con 1.000, 5.000, 10.000, 20.000, 40.000 y 80.000 partículas virales que fueron posteriormente procesadas como se explicó anteriormente.

Determinación de los tiempos y temperaturas de conservación del ARN viral

Con el fin de verificar si el papel cromatográfico permite la conservación del ARN viral por largos periodos de tiempo, se diseñó un experimento en el cual se sembraron gotas de semen contaminado con 50.000 copias de virus, que fueron almacenadas a distintas temperaturas (TA, 4°C, -20°C y -70°C) por 1 día, 7 días, 6, 12 y 18 meses.

Al cumplirse cada periodo de tiempo, se cortaron 4 discos de cada gota con sacabocados, que fueron eluidos en 220 μ L de MEM por 30 minutos en agitación. Posteriormente se realizó la extracción de ARN, seguida de RT -qPCR descrita anteriormente. Por cada condición, se realizaron 5 repeticiones.

De la misma manera, se realizó el experimento en tarjetas FTA, para lo cual se sembraron 5 gotas de semen contaminado por cada condición (TA, 4°C, -20°C, -70°C) por 12 y 18 meses, con el objetivo de verificar si el ARN del VDVB puede conservarse por largos periodos de tiempo y definir cuál es la mejor temperatura de almacenamiento.

Condiciones de elución en semen dadas las dificultades para recuperación de ARN:

Debido a las dificultades a la hora de recuperar ARN en muestras de semen sembradas en papeles, se evaluaron varias condiciones sugeridas en la bibliografía:

- 1) Un paso previo al proceso de elución que consistió en agregar 20 μ L de DTT (ditiotreitól) 0,1 M a la gota de semen seco sembrado en papel, manteniéndolo a TA hasta secar. Luego de esto, se continuó el proceso de elución detallado anteriormente (Sarangi et al., 2018).
- 2) Tres lavados con reactivo FTA sobre los discos contaminados previo a la extracción de ARN (Cardona-Ospina et al., 2019; Liang et al., 2014).
- 3) Comparación de la recuperación de ARN a partir de semen puro vs. en pajuelas (con diluyente para congelado).
- 4) Protocolo de elución y posterior reacción de retrotranscripción, sin extracción de ARN (Cardona-Ospina et al., 2019).
- 5) Protocolo de retrotranscripción con paso previo de desnaturalización (95°C por 5 minutos y luego hielo por 5 minutos)

4.2.3 Monitoreo de DVB en un establecimiento de producción de leche

Criterios de selección y características del establecimiento

Se trabajó con un establecimiento de producción lechera de la provincia de Santa Fe para aplicar un plan de monitoreo durante el plazo de 3 años.

El establecimiento seleccionado para el monitoreo pertenece a la zona de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Esperanza. Se encuentra ubicado dentro de la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja, dependiente de la Universidad Nacional del Litoral, con aproximadamente 160 vacas en ordeño y reposición propia.

El criterio de selección se basó en la factibilidad de que los responsables de los establecimientos realicen los cambios necesarios en la metodología de trabajo para evitar la introducción del virus y estén dispuestos a llevar a cabo un plan de saneamiento en caso de detectar animales PI.

Cuestionario a los encargados

Se analizó el tipo de manejo, uso de vacunas, antecedentes de cuadros respiratorios, abortos, ingreso de hacienda o semen y toda información que se considere relevante respecto de la presunción de la enfermedad por VDVB. Para esto, se realizó un cuestionario al encargado del establecimiento previo al inicio del monitoreo, en la cual se recolectaron datos de: composición del rodeo (cantidad de animales por categoría), reposición (propia/externa), servicio (inseminación artificial/servicio natural), testeo de semen/toros contra VDVB, presencia de otras especies animales (bubalinos, ovinos, caprinos, porcinos, etc.), casuística de abortos y

enfermedad respiratoria, vacunación contra DVB (tipo de vacuna, esquema de vacunación) y otros, como el uso de agujas individuales por cada animal.

Medidas adoptadas durante plan de saneamiento/monitoreo

Para el desarrollo de este objetivo, surgieron en principio dos posibilidades:

1. En caso de que se detectaran animales positivos a VDVB, se realizaría el saneamiento del establecimiento. Este incluiría las siguientes medidas:
 - a. Muestreo de todos los bovinos presentes en el establecimiento para proceder a la detección de animales PI mediante la RT-qPCR desarrollada. Éstos se testean en *pooles* conformados por 10 sueros individuales. En el caso de que se encontraran *pooles* positivos, estos se abrirían para analizar individualmente a todos los sueros que lo componen. El resultado positivo de estas determinaciones puede deberse tanto a animales virémicos que cursan infecciones agudas como a animales PI. Por ello, 3 o 4 semanas después de la primera toma de muestra, se vuelven a testear esos animales. Los bovinos que en esta instancia sean nuevamente positivos, serán considerados PI y apartados del establecimiento.
 - b. Cuarentena y testeo de todos los animales ingresados al establecimiento, para demostrar que están libres de VDVB.
 - c. Testeo de terneros nacidos de hembras que ingresan preñadas al establecimiento.
 - d. Uso de semen certificado libre de VDVB o testeo del adquirido para inseminación.
 - e. Control del contacto entre los bovinos y otras especies (ovinos, caprinos, porcinos) que pueden ser reservorios de *Pestivirus*. Si en el establecimiento, los bovinos convivieran con otros animales, éstos deberían ser testeados.
 - f. En casos de abortos, malformaciones, enfermedad respiratoria o cualquier otro cuadro en el que se sospeche del VDVB como agente causal, se deberían remitir muestras al laboratorio para su procesamiento.
 - g. Bioseguridad estricta para evitar la reintroducción del VDVB: eliminación del contacto con establecimientos vecinos mejorando las delimitaciones y la desinfección del equipamiento y materiales utilizados por los veterinarios que trabajan en el establecimiento.
2. En el caso de que no se detectaran animales positivos y no hubiera circulación viral, se realizaría un monitoreo y las acciones a llevarse a cabo estarían destinadas a evitar la introducción del virus al rodeo. Por lo tanto, luego del testeo de todos los animales

presentes en el establecimiento y la constatación de que todos fueran negativos, se aplicarían las siguientes medidas: cuarentena y testeo de todos los bovinos ingresados al establecimiento, uso de semen libre, testeo de terneros nacidos de hembras compradas, control del contacto de los bovinos con especies que puedan ser reservorios del virus, diagnóstico en caso de cuadros clínicos sospechosos de VDVB, así como las medidas de bioseguridad previamente mencionadas.

Toma y procesamiento de muestras

Al inicio del monitoreo y periódicamente durante la duración del mismo, se tomaron muestras de leche de tanque. Las muestras BTM fueron procesadas mediante un kit comercial de ELISA de detección de anticuerpos anti-NS3 (mencionado anteriormente en sección 1.2) para conocer anticipadamente si en el establecimiento existía circulación viral. Esta muestra resulta representativa de un gran número de animales que componen el rodeo, que son las vacas en ordeño.

Se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante de 200 bovinos de leche, que incluyeron: 159 vacas en ordeño, 30 animales de recría y 11 de crianza. Al momento del muestreo no había en el establecimiento ningún animal de categoría vaca seca.

El establecimiento cuenta además con 61 animales de cría, que se encuentran en potreros aledaños al tambo y en ocasiones comparten bebederos con los bovinos de leche, por lo cual también fueron muestreados. Este grupo estaba conformado por 45 madres y 16 terneros al pie.

Luego del muestreo de todos los bovinos presentes en el establecimiento, no se detectaron individuos PI, por lo tanto, se procedió a realizar un plan de monitoreo (detallado en el punto 2), en vez del saneamiento anteriormente previsto.

Nueve meses después del primer muestreo, se realizó un segundo muestreo para testear a 33 terneros nacidos de hembras preñadas al momento del primer muestreo.

Por otra parte, en quince oportunidades entre 2019 y 2021, se tomaron muestras de hembras abortadas, fetos y terneros con malformaciones que fueron testeadas mediante RT-qPCR con el fin de detectar el virus en caso de que estuviera presente. Los casos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Casos clínicos sospechosos de Diarrea Viral Bovina presentados en el periodo 2019-2021 en el establecimiento estudiado

Fecha	Identificación	Cuadro
09/19	Sin Nro.	Ternero con malformación
11/19	1039	Muerte embrionaria
12/19	994	Aborto de 4,5-6 meses de gestación
6/20	1016	Aborto de 3 meses de gestación
7/20	911	Aborto de mellizos, 8 meses de gestación
9/20	B465	Ternero con incoordinación
12/20	1110	Aborto de 2,5-4 meses de gestación
12/20	1122	Aborto de 2,5-4 meses de gestación
12/20	1130	Aborto de 2,5-4 meses de gestación
10/21	1159	Muerte embrionaria
10/21	1152	Muerte embrionaria
10/21	1054	Aborto de 3-4 meses de gestación
10/21	1091	Aborto de 3-4 meses de gestación
10/21	1073	Aborto de 3-4 meses de gestación
10/21	1229	Ternero con malformación

Referencias. Fecha de toma de muestra, identificación de los animales y cuadros clínicos observados.

4.2.4 Caracterización filogenética de cepas de VDVB de la provincia de Santa Fe

Se solicitaron muestras de casos clínicos ingresados al Hospital de Salud Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral y de veterinarios privados para realizar la genotipificación y análisis filogenético de las cepas locales de VDVB.

Para este estudio se evaluaron las secuencias obtenidas de 11 cepas del VDVB, cuyo lugar de procedencia y cuadro clínico se muestra en la Tabla 3. Para la caracterización filogenética, las muestras obtenidas se sometieron a una RT-PCR de punto final, estandarizada previamente por el laboratorio de biología molecular del IVIT del CICVyA INTA Castelar. Se cortaron y purificaron las bandas de agarosa con un kit comercial (GE, cat. 28903470) y luego se secuenció el fragmento 5'UTR de los VDVB encontrados (Unidad de Genómica del CICVyA). Para el análisis filogenético, en un primer paso se alinearon y analizaron las secuencias con el programa Bioedit (versión 7.2) donde se construyó una matriz que integró secuencias de cepas de referencia, de aislamientos locales y de otras regiones obtenidas de bancos de genes (*Genbank*). Además, se incluyó como cepa *outgroup* la secuencia de un aislamiento de virus de la Peste Porcina Clásica (GQ898885 CSFV Nchills). Una vez obtenida la matriz se realizaron alineamientos múltiples utilizando el programa Clustal X Versión 1.8.3 y consecuentemente se realizó la matriz de distancia bajo el

método Kimura 2 parámetros. Los dendrogramas se realizaron utilizando el programa Mega, versión X, utilizando dos métodos: uno con el modelo de Neighbor Joining y *bootstraps* con 1000 repeticiones y otro con Neighbor Joining, usando el método de Maximum composite likelihood. Las secuencias nucleotídicas obtenidas en esta tesis se cargaron a la base de datos de *GenBank*.

Tabla 3. Cepas secuenciadas durante el periodo 2019-2022 provenientes de casos clínicos de la provincia de Santa Fe

Nombre	Año	Procedencia	Cuadro
18/2019	2019	Dpto. Caseros	Neumonía
84/2015	2015	Dpto. San Lorenzo	Neumonía
85/2015	2015	Dpto. San Lorenzo	Neumonía
89/2015	2015	Dpto. San Lorenzo	Neumonía
IC	2020	Dpto. Las Colonias	Muerte perinatal
N.T-2020	2020	Dpto. Las Colonias	Natimorto
S.2-2020	2020	Dpto. San Cristóbal	Enfermedad de las mucosas
CD22	2022	Dpto. San Cristóbal	Malformación
L3	2022	Dpto. San Cristóbal	Infección inaparente
PA1	2022	Dpto. Las Colonias	Enfermedad de las mucosas
SA1	2022	Dpto. Las Colonias	Enfermedad de las mucosas

Referencias. Nombre designado, año de recolección, localidad de procedencia y cuadro clínico vinculado a las 11 cepas analizadas.

5. RESULTADOS

5. Resultados

5.1.1 Desarrollo de un ELISA para detección de anticuerpos anti VDVB en muestras de suero y leche.

Como se mencionó anteriormente, el ELISA para la detección de anticuerpos anti-NS3 aún se encuentra en desarrollo. A continuación, se mencionan los resultados hallados hasta el momento.

Respecto al tipo de placa utilizada, no se observaron diferencias importantes en cuanto a la DO (densidad óptica) en los distintos tipos de placas evaluados. Sobre las concentraciones de la proteína testeadas (1000 ng/well, 500 ng/well, 250 ng/well, 125 ng/well, 62,5 ng/well), las mayores diferencias entre la DO del suero positivo y negativo se observaron en la concentración de 125 ng/well. De la misma manera, entre las diluciones de suero analizadas (1/10; 1/20; 1/40; 1/50; 1/60; 1/80; 1/90; 1/120; 1/160; 1/250), con una concentración de 125 ng/well de proteína, las mayores diferencias entre la DO del suero positivo y suero negativo se observaron en la dilución de 1/60.

En relación con las soluciones utilizadas para la dilución de los sueros y el conjugado, los mejores resultados de DO se observaron utilizando PBS Tween 20 (0,05%) + 5% SNE para los sueros evaluados. Para el bloqueo, los mejores valores de DO se obtuvieron al combinar PBS Tween 20 + 5% SNE, durante una hora a 37°C. El volumen utilizado (50 µL y 300 µL) no produjo cambios en la lectura de la DO. Con respecto a las diluciones del conjugado analizadas, las mejores DO se observaron con la dilución de 1/20000. Así mismo, para los lavados, no se observaron diferencias entre la cantidad de lavados ni la solución utilizada para el lavado.

En base a esto, las condiciones y tiempos de incubación de las diferentes fases fueron:

- Tiempo de pegado de la proteína: ON a 4°C.
- Bloqueo: una hora a 37°C con PBS Tween 20 (0,05%) + 5% SNE.
- Incubación con el suero problema: 1 hora a 37°C.
- Incubación con el conjugado: 1 hora a 37°C.
- Revelado: 10 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- Como solución de *stop* se utilizó ácido sulfúrico 2 M.
- Lectura a 450 nm.

Pese a las pruebas realizadas, y tomando las mejores condiciones, la diferencia en la densidad óptica entre los sueros controles positivos y negativos testeados fue muy baja (0,2), lo que dificulta la diferenciación entre positivos y negativos a la hora de testear muestras clínicas.

5.1.2 Realización de muestreos de BTM en establecimientos lecheros de la provincia de Santa Fe y determinación de la presencia de anticuerpos anti-VDVB mediante un test de ELISA

Sobre el total de muestras BTM analizadas, solo dos tambos resultaron negativos (0,76%): uno de la localidad de Las Rosas (departamento Belgrano) y otro de San Jorge (departamento San Martín). Los departamentos de donde provienen las muestras y la cantidad de muestras positivas respecto al total de muestras se observan en la Figura 5.

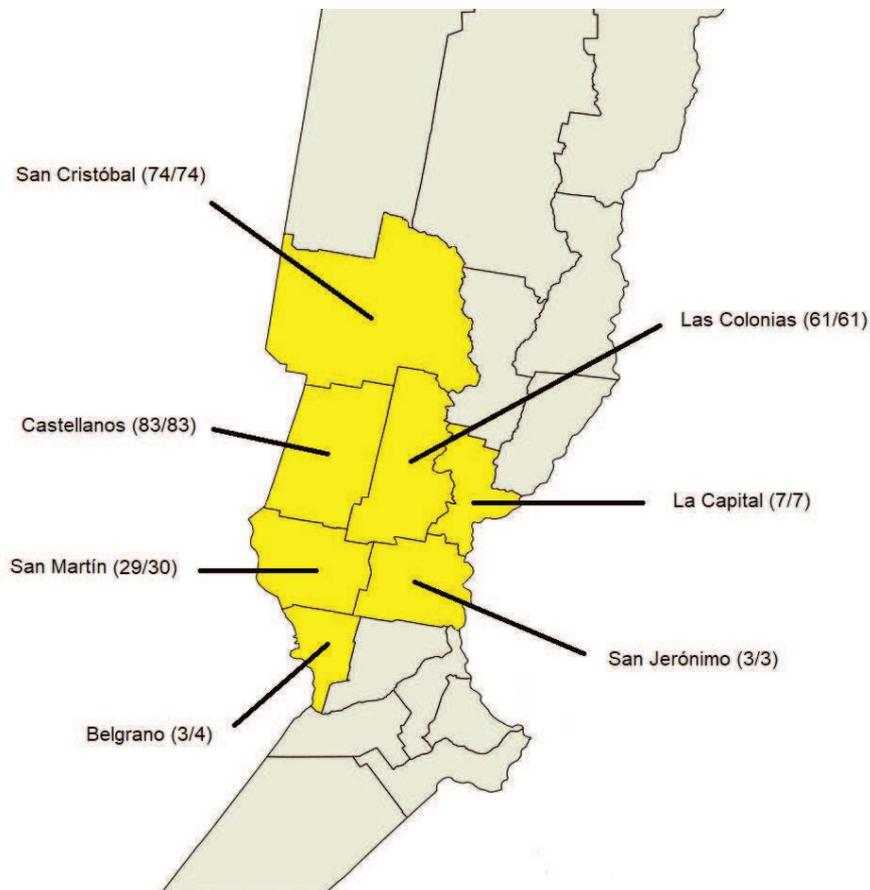


Figura 5. Muestras BTM positivas al ELISA para la detección de anticuerpos anti-NS3 respecto al total de muestras estudiadas por departamento de la provincia de Santa Fe. Los departamentos incluidos en el muestreo se observan de color amarillo. La cantidad de positivos sobre el total de muestras BTM estudiadas en cada departamento está indicada entre paréntesis.

5.2.1 RT-qPCR para la detección de VDVB en muestras de suero y semen

Respecto al ajuste de concentración de los *primers*, la mejor eficiencia se observó en 470 nM (0,47 μ M). El rango lineal de detección de la qPCR fue desde $2,5 \cdot 10^9$ a $2,5 \cdot 10^1$ copias de ADN/mL, con una eficiencia de 97,3%, una pendiente de -3,389 y un coeficiente de regresión de 0,994. En base a los cálculos realizados con el plásmido, la qPCR detectó hasta 2,5 copias (LOD) (Figura 6).

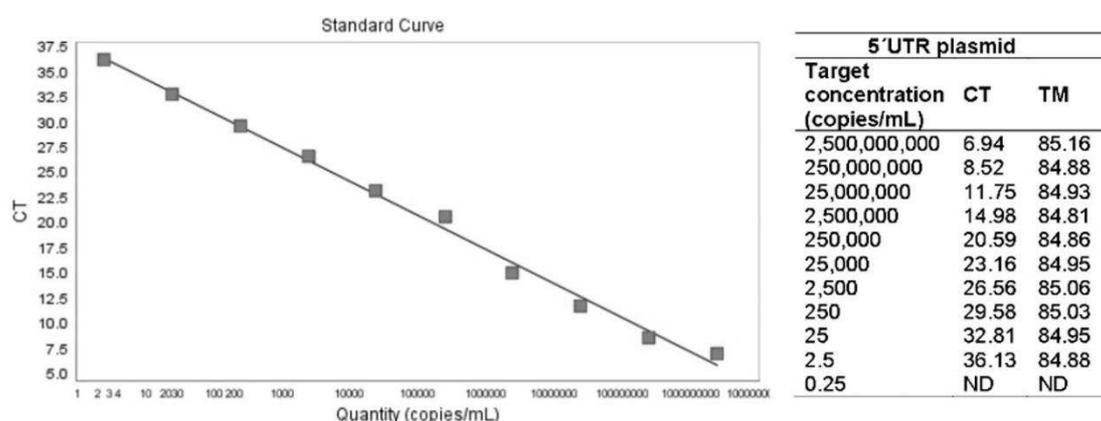


Figura 6. Rango lineal de detección y límite de detección (LOD) del plásmido 5'UTR del VDVB en la qPCR desarrollada. Izquierda: rango lineal de detección del plásmido mediante la qPCR desarrollada por triplicado. Derecha: valores de CT (*cycle threshold*) y TM (temperatura de *melting* en $^{\circ}$ C) para las diluciones del plásmido 5'UTR en base 10. ND: no detectado.

Respecto a la sensibilidad de la qPCR en la detección del stock viral, la prueba amplificó hasta 5 copias de ARN viral. En las matrices de suero y semen, la qPCR fue capaz de detectar hasta 50 copias de ARN (Tabla 4). Respecto de la capacidad de la RT-qPCR para detectar animales positivos en muestras en *pool*, la prueba permitió detectar un suero positivo en un *pool* conformado por 30 sueros bovinos (Tabla 5).

Tabla 4. Límite de detección del fragmento de interés para diferentes matrices

Concentración del <i>target</i> (copias/mL)	Stock viral	Suero	Semen
500.000	+	+	+
50.000	+	+	+
5.000	+	+	+
500	+	+	+
50	+	+	+
5	+	ND	ND

Referencias. Número de copias detectadas por la qPCR en diferentes matrices: stock viral (*Pestivirus B vs253*), suero y pajuelas de semen. Los resultados se expresan como el 95% de concordancia entre 12 réplicas. ND: no detectado.

Tabla 5. Detección del fragmento de interés en pools de suero

Tamaño del <i>pool</i> (número de muestras individuales dentro del <i>pool</i>)	CT
10	30,3
20	30,7
30	32,2
40	ND*
50	ND

Referencias. Media de CT (*Cycle Threshold*) de tres réplicas de los diferentes tamaños de *pool* evaluados. ND: no detectado. *Se detectó en 1 de las 3 réplicas

Respecto a la especificidad, la qPCR no amplificó los microorganismos no relacionados al VDVB (VRSB, PI-3, HVB-1, HVB-5, VLA, RVA y *Mycoplasma bovis*.). Adicionalmente, el test permitió detectar todas las cepas de *Pestivirus* bovinos evaluadas, con un rango específico de TM (*melting temperature* o temperatura de *melting*) entre 84,69 a 85,78°C. Los valores de TM para cada cepa evaluada se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de TM (temperatura de *melting*) para las cepas de *Pestivirus* bovinos detectadas por la RT-qPCR

Cepa	TM (°C)
VDVB-1a Singer	85,41
VDVB-1a MF120553	85,50
VDVB-1a 88625	85,78
VDVB-1a 71267	85,2
VDVB-1b 63588	85,08
VDVB-1b 90611	85,59
VDVB-1b MF120552	85,10
VDVB-1b 59473	85,32
VDVB-1b 83532	85,62
VDVB-1b 73611	84,81
VDVB-1b MF120594	85,22
VDVB-1b 78256	85,42

VDVB-1b 25366	85,32
VDVB-2 76/08	85,36
VDVB-2 vs253	85,59
VDVB-2 MF120585	85,44
VDVB-2 MF120586	85,61
VDVB-3 LV210185K/13	84,69
VDVB-3 MK017821	84,80
VDVB-3 MH992643	85,58
VDVB-3 MZ189735	85,1
VDVB-3 MZ189734	84,92

Referencias. En la primera columna figura el genotipo y nombre o número de acceso al *GenBank* de cada cepa. TM: temperatura de *melting*.

Los resultados de precisión de las pruebas sobre el plásmido 5'UTR y el stock viral mostraron un desvío estándar relativamente bajo y poca dispersión de los valores de CT respecto del promedio (Tabla 7). Por otro lado, respecto a los análisis inter-laboratorio, fue posible detectar el plásmido en los tres laboratorios usando distintos cicladores con valores de CT entre 16,92 y 21,54.

Tabla 7. Repeticiones de controles positivos

	n	Promedio	Desvío estándar	CVpp	CVa%
Plásmido 5'UTR (2,5.10³ copias)	10	21,36	1,49	14,94	8,96
<i>Pestivirus B vs253</i> (5,62.10⁶ copias)	25	13,78	1,94	10,63	6,38

Referencias. Número de repeticiones (n), promedio de CT (cycle threshold), desvío estándar, coeficiente de variación ponderado (CVpp) y error aleatorio máximo permitido (CVa%) de las repeticiones de los controles positivos.

Las muestras clínicas recolectadas de animales infectados naturalmente (previamente clasificadas como positivas a VDVB mediante métodos “*gold standard*”) resultaron positivas al analizarse mediante la RT-qPCR desarrollada, con valores de CT entre 15,54 y 34,83 (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación de técnicas diagnósticas (aislamiento viral y RT-qPCR) en muestras clínicas

Cepa	Genotipo	Número de acceso <i>GenBank</i>	Tipo de muestra	Cuadros Clínicos	Aislamiento Viral	RT-qPCR
73611	VDVB 1b	JX848352	Intestino	Entéricos	+	+

88625	VDVB 1a	JX679695	Feto	Reproductivos	+	+
71267	VDVB 1a	JX848354	Feto	Reproductivos	+	+
83532	VDVB 1b	JX848353	Feto	Reproductivos	+	+
59473	VDVB 1b	JX848355	Intestino	Entéricos	+	+
63588	VDVB 1b	JX848356	Intestino	Entéricos	+	+
78256	VDVB 1b	JX848357	Feto	Reproductivos	+	+
25366	VDVB 1b	JX848358	Hisopado Nasal	Respiratorios	+	+
98/204	VDVB 1b	JX848359	Feto	Reproductivos	+	+
86261	VDVB 1b	JX848360	Hisopado Ocular	ND	+	+
95/008	VDVB 2a	AY273777	Esófago	Entéricos	+	+
90611	VDVB 1b	JX679694	Feto	Reproductivos	+	+
82018	VDVB 1b	JX848361	Pulmón	Respiratorios	+	+
86275	VDVB 2b	JX679696	Hisopado Nasal	Respiratorios	+	+
95409	VDVB 1b	JX848362	Esófago	Enfermedad de las Mucosas	+	+
14109	VDVB 1a	JX848363	Sangre	Infección Persistente	+	+
8/146	VDVB 1b	JX679698	Sangre	Respiratorios	+	+
8/105	VDVB 1b	JX679697	Sangre	Entéricos	+	+
8/724	VDVB 1b	JX679693	Feto	Reproductivos	+	+
9/134	VDVB 1b	JX679690	Bazo	Respiratorios	+	+
9/366	VDVB 1b	JQ646074	Sangre	Reproductivos	+	+
9/295	VDVB 1b	JX679692	Sangre	Entéricos	+	+
9/55	VDVB 1b	JX679689	Intestino	Entéricos	+	+
9/792	VDVB 1b	JX679688	Sangre	Enfermedad de las Mucosas	+	+
9/464	VDVB 1b	JQ646073	Sangre	Infección Persistente	+	+
8/707	VDVB 1b	JX679687	Hisopado Nasal	Respiratorios	+	+
9/165	VDVB 1b	JX679691	Bazo	Enfermedad de las Mucosas	+	+
13223	VDVB 1b	JX848365	Sangre	Infección Persistente	+	+

Referencias. Nombre de la cepa, Genotipo, Número de acceso al *GenBank*, tipo de muestra, cuadro clínico presentado y resultados del aislamiento viral y RT-qPCR de 28 muestras clínicas analizadas. ND: no determinado

Finalmente, el gen GAPDH, utilizado para monitorear la extracción de ácidos nucleicos y la posible presencia de inhibidores de PCR, resultó positivo en todos los ensayos, con valores de TM entre 80 y 81°C y valores de CT homogéneos (20 ± 3) para todas las muestras bovinas evaluadas.

5.2.2 Muestreo y procesamiento DBT

Evaluación de método de elusión, control de papeles sin sembrar y porcentaje de recuperación respecto a la muestra fresca

Respecto al control de los papeles utilizados sin sembrar muestras, como era de esperarse, ambos (papel cromatográfico y tarjetas FTA) resultaron negativos a la RT-qPCR. Por otro lado, cuando se evaluaron los tiempos de elusión, se observaron pequeñas diferencias en los valores de CT entre las dos metodologías evaluadas (30 minutos y ON en agitación): CT promedio para elusión de 30 minutos de 23,9 y para elusión ON de 26,2 para sangre y CT promedio de 33,8 (30 minutos) y 35,8 (ON) para semen.

El porcentaje de recuperación de la muestra de sangre sembrada en papel cromatográfico respecto a la muestra fresca (sangre contaminada) resultó del 90,7% (CT promedio de sangre sembrada en papel: 27 y CT promedio de sangre fresca: 24,5). Para semen, los resultados fueron similares, con un 97,2% de recuperación respecto de la muestra fresca (CT promedio de semen fresco: 35,3 y CT promedio de semen sembrado en papel: 36,3).

Sangre sembrada en papeles

El límite de detección para sangre contaminada con distintas concentraciones del *target* se observa en la Tabla 9. La RT-qPCR permitió detectar 1.000 copias de ácido nucleico viral en las gotas de sangre contaminada para tal fin y sembradas en papel cromatográfico.

Tabla 9. Límite de detección del *target* en distintas concentraciones para sangre contaminada en papeles

Concentración del <i>target</i> (copias/mL)	Sangre
80.000	+
40.000	+
20.000	+
10.000	+

5.000	+
1.000	+
100	ND

Referencias. Los resultados se expresan como el 95% de concordancia entre 12 réplicas. ND: no detectado

Respecto al almacenamiento de gotas de sangre contaminada en papeles en distintas temperaturas y tiempos, a medida que se prolongó el almacenamiento, el porcentaje de recuperación de ARN disminuyó. Las gotas sembradas en papel cromatográfico y almacenadas por 1 y 7 días mostraron un porcentaje de recuperación mayor respecto al control positivo al compararlas con las almacenadas por 6 y 12 meses. Respecto a las temperaturas, en general, 4°C, -20°C y -70°C fueron más efectivas preservando el ARN viral que la temperatura ambiente, con una tendencia más marcada a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento (Tabla 10a).

Al analizar los resultados de las gotas almacenadas por 12 meses, los resultados fueron similares en ambos tipos de papeles (cromatográfico y tarjetas FTA) (Tabla 10b), sin diferencias significativas entre ambos tipos de papeles a 4°C ($p=0,865$) y a -20°C ($p=0,776$) usando el test T de Student, ni a 4°C ($p=0,500$) y a -20°C ($p=0,500$) usando el test de Fisher.

Desafortunadamente y por motivos ajenos, no fue posible procesar las gotas de sangre almacenadas a -70°C por 12 meses en ambos tipos de papeles.

A los 18 meses de almacenamiento, los resultados fueron negativos para ambos tipos de papeles, tanto para temperatura ambiente como para 4°C y -20°C.

La recuperación de ARN proveniente de muestras clínicas (sangre de dos animales PI) sembradas en papel cromatográfico fue satisfactoria. Para un día de almacenamiento los CT fueron 28,39 y 32,9, para 6 meses fueron 23,93 y 33,75 y para 12 meses fueron 29,93 y 27,56, respectivamente. Esto sugiere que aún al año de almacenamiento a 4°C, no hay una significativa pérdida o degradación de ARN en el papel cromatográfico utilizando sangre de animales PI (1 día vs. 6 meses, $p: 0,620$; un día vs. 12 meses, $p: 0,679$; 6 meses vs. 12 meses, $p: 0,990$). Por el contrario, a los 18 meses de almacenamiento a 4°C, ambas muestras fueron negativas.

Tabla 10. Media de CT, número de determinaciones positivas entre las réplicas, desvío estándar y porcentaje de recuperación respecto al control positivo (fresco) de 1 día, 7 días, 6 meses y 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, 4°C, -20°C y -70°C para sangre contaminada sembrada en papeles de filtro

a	TA			4°C			-20°C			-70°C		
	Media CT	DP	DS									
1 día	27,14	5	2,09	25,58	4	0,57	25,64	5	1,98	27,23	4	1,78
% recuperación	<u>84,16</u>			<u>89,29</u>			<u>89,08</u>			<u>83,88</u>		
7 días	28,77	5	4,67	28,67	5	0,99	28,47	5	1,12	26,26	5	2,12
% recuperación	<u>79,39</u>			<u>79,67</u>			<u>80,22</u>			<u>86,98</u>		
6 meses	32,1	3	1,18	25,12	3	1,73	24,83	5	0,84	22,02	5	0,99
% recuperación	<u>48,35</u>			<u>61,78</u>			<u>62,51</u>			<u>57,67</u>		
12 meses	ND	0	-	27	4	0,6	26,87	4	0,96		NP	
% recuperación	<u>0</u>			<u>67,81</u>			<u>68,14</u>					

b	TA			4°C			-20°C			-70°C		
	Media CT	DP	DS	Media CT	DP	DS	Media CT	DP	DS	Media CT	DP	DS
12 meses	ND	0	-	27,11	3	0,55	28,52	3	8,78			NP
% recuperación	<u>0</u>			<u>67,81</u>			<u>64,20</u>					

Referencias. a. resultados en papel cromatográfico. b. resultados de tarjetas FTA. TA: temperatura ambiente. CT: cycle threshold. DP: número de determinaciones positivas entre las 5 réplicas. DS: desvío estándar. %recuperación: porcentaje de recuperación. ND: no detectado. NP: no procesado.

Semen sembrado en papeles

El límite de detección evaluado para semen se muestra en la Tabla 11, donde puede observarse que pudo detectarse ARN viral en las gotas contaminadas con más de 40.000 copias virales.

Tabla 11. Límite de detección del target en distintas concentraciones para semen contaminado sembrado en papeles

Concentración del target (copias/mL)	Semen
80.000	+

40.000	+
20.000	ND
10.000	ND
5.000	ND
1.000	ND
100	ND

Referencias. Los resultados se expresan como el 95% de concordancia entre 12 réplicas. ND: no detectado.

El semen contaminado sembrado en papel cromatográfico y almacenado en distintas temperaturas y tiempos arrojó resultados inconsistentes. Para un día de almacenamiento, solo dos repeticiones fueron positivas para temperatura ambiente y 4°C. Para -20°C y -70°C solo una de las repeticiones resultó positiva. De la misma manera, para 4 días de almacenamiento, solo una repetición resultó positiva para TA y 4°C, siendo negativas las 5 réplicas de -20°C y -70°C. Más aún, para 7 días de almacenamiento, todas las gotas de semen evaluadas resultaron negativas, excepto una de las almacenadas a -70°C. Estos resultados pueden observarse en la Tabla 12.

Tabla 12. CT (cycle threshold) de las 5 repeticiones de cada condición (tiempos y temperaturas) de almacenamiento de semen en papeles sin tratamiento con DTT

	TA	4°C	-20°C	-70°C
1 Día	ND	32,28	ND	ND
	ND	ND	42,09	ND
	28,39	31,63	ND	ND
	30,5	ND	ND	28,67
	ND	ND	ND	ND
4 Días	ND	30,17	ND	ND
	30,74	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
7 Días	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	28,91
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND

Referencias. TA: Temperatura ambiente. ND: no detectado.

Dados los inconvenientes en la recuperación del ARN a partir de gotas de semen contaminado sembrado en papeles y a partir de una búsqueda bibliográfica, se evaluaron 3 protocolos distintos con la intención de mejorar las probabilidades de recuperar material genético a partir de semen sembrado en papel. Los resultados de las metodologías llevadas a cabo fueron:

- 1) Pre-tratamiento con DTT (por duplicado): CT de 36 en ambas réplicas.
- 2) Lavado previo con reactivo FTA (por duplicado): ambas réplicas fueron negativas.
- 3) Comparación de la recuperación de ARN a partir de muestras de semen puro y pajuelas contaminados sembrados en papel cromatográfico (por duplicado):
 - Pajuela sin DTT: ambos negativos
 - Pajuela con DTT: una negativa y otra positiva (CT: 36,02)
 - Semen puro sin DTT: ambos negativos.

- Semen puro con DTT: una negativa y otra positiva (CT: 37,19)
Puede observarse que los resultados para ambas matrices fueron similares.
- 4) Protocolo de elución y posterior reacción de retrotranscripción, sin extracción de ARN: ambas réplicas fueron negativas.
 - 5) Protocolo de retrotranscripción con paso previo de desnaturalización (95°C por 5 minutos y luego hielo por 5 minutos): una réplica positiva (CT de 36) y otra negativa.

A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta que la utilización del pre-tratamiento con DTT mejoró levemente las posibilidades de recuperación de ARN, se procesaron las muestras almacenadas por 6 meses siguiendo esta metodología.

Para el protocolo con pre-incubación con DTT, los resultados tampoco fueron satisfactorios (Tabla 13). Puede observarse que pocas repeticiones resultaron positivas, con valores de CT elevados. De las temperaturas evaluadas, la más prometedora fue la de -20°C, con 4 de 5 repeticiones positivas, sin embargo, el porcentaje de recuperación de ARN respecto al control positivo fue bajo. Dada la inconsistencia en los resultados, las muestras no fueron analizadas en los tiempos de almacenamiento subsiguientes.

Tabla 13. CT (*cycle threshold*) de las 5 repeticiones de semen sembrado en papel cromatográfico con tratamiento previo con DTT y porcentaje de recuperación de la media de las repeticiones positivas

Temperatura	Repeticiones					% recuperación
TA	ND	ND	ND	ND	37,29	54,28
4°C	ND	ND	ND	ND	ND	-
-20°C	ND	36,7	36,51	36,7	37,13	55,06
-70°C	ND	ND	36,7	37	ND	54,93

Referencias. TA: temperatura ambiente. ND: no detectado

5.2.3 Monitoreo de la DVB en establecimientos de producción de leche

Al momento de la encuesta al encargado del establecimiento, el rodeo estaba compuesto por 93 vacas en ordeño, 20 vacas secas, 16 terneros en crianza artificial (10 hembras y 6 machos), 25 animales en recría 1 (18 hembras y 7 machos), 19 hembras en recría 2 y 26 hembras en recría 3. El rodeo no contaba con ningún animal en categoría toro. Además, el establecimiento utilizaba reposición propia, realizaba servicio por inseminación artificial, y estaba integrado por otras especies animales como ovinos, caprinos, bubalinos y cerdos, aunque sólo los bubalinos compartían espacios ocasionalmente con los bovinos. Por su parte, el encargado manifestó que,

en el rodeo, no se presentaban habitualmente casos de enfermedad respiratoria durante la crianza o recría ni en hembras adultas, sin embargo, sí se han presentado casos de aborto con causa infecciosa como presuntivo. Además, en los animales se aplicaba trimestralmente una vacuna reproductiva polivalente (virus de Rinotraqueítis infecciosa bovina inactivado, virus de la Diarrea viral bovina inactivado, bacterinas de *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter fetus venerealis*, *Histophilus somni*, *Leptospira interrogans* serovares Pomona y Canicola) a hembras mayores a 6 meses y se usaban agujas nuevas por cada animal cuando se realizan maniobras sobre éstos (aplicación de vacunas, inyectables, sangrado, etc.). La encuesta completa se encuentra en el Anexo II.

Las muestras BTM tomadas al inicio del monitoreo y durante la duración del mismo para la detección de anticuerpos anti-NS3 del VDVB resultaron negativas, indicando la ausencia de circulación viral.

Respecto a las muestras individuales, se conformaron 21 *pooles* de sueros de bovinos de leche y 7 de bovinos de carne, conteniendo entre 8 y 10 muestras cada *pool*. El genoma viral del VDVB no fue detectado por RT-qPCR en ninguno de los *pooles* analizados.

Como se mencionó anteriormente, debido a estos resultados, las medidas a tomar no incluyeron un saneamiento del virus, sino un monitoreo con el fin de evitar la introducción del virus al rodeo. Para ello, se llevaron a cabo las siguientes actividades: mejora de las delimitaciones del establecimiento, desinfección del equipamiento y materiales utilizados por los trabajadores del establecimiento, cuarentena y testeo de los bovinos ingresados al establecimiento, uso de semen libre de VDVB, testeo de terneros nacidos de hembras preñadas al momento del primer muestreo, control del contacto de los bovinos con especies que puedan ser reservorios del virus y diagnóstico en caso de cuadros clínicos sospechosos de VDVB.

En los 15 casos de aborto, muerte embrionaria y nacimiento de terneros con malformaciones tampoco se detectó VDVB mediante RT-qPCR. En el segundo muestreo, realizado meses después a 33 terneros nacidos de vacas que se encontraban gestando durante el primer muestreo, tampoco se detectó ácido nucleico viral.

5.2.4 Caracterización filogenética.

Los análisis filogenéticos realizados sobre las 11 cepas secuenciadas permitieron la obtención de árboles filogenéticos que se muestran en la Figura 7. Los dendrogramas muestran tres grandes *clusters*. El primero conformado por los sub-genotipos a, b y c del genotipo 1 del VDVB. El segundo incluye los sub-genotipos a y b del genotipo 2 y el último incluye a los virus HoBi-Like. En ambos casos, puede observarse la ubicación de 9 de las cepas secuenciadas de la provincia de Santa Fe dentro del genotipo 1b y las dos restantes en los *cluster* del genotipo 1a y

2b, respectivamente. En la Tabla 14 se resumen los datos de las 11 cepas y se incluyen los genotipos y sub-genotipos a los cuales pertenece cada cepa y el porcentaje de homología respecto a cepas de referencia de cada genotipo obtenidas en la base de datos de *GenBank* (obtenido a través de blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Tabla 14. Identificación, año de recolección, localidad de procedencia, cuadro clínico, genotipo, número de acceso al *GenBank* y porcentaje de homología de las 11 muestras secuenciadas provenientes de la provincia de Santa Fe

Identificación	Año	Procedencia	Cuadro	Genotipo	Nro. <i>GenBank</i>	% Homología
18/2019	2019	Dpto. Caseros	Neumonía	1b	MW316591	98,50%
84/2015	2015	Dpto. San Lorenzo	Neumonía	1b	MW316592	96,94%
85/2015	2015	Dpto. San Lorenzo	Neumonía	1a	MW316593	95,92%
89/2015	2015	Dpto. San Lorenzo	Neumonía	1b	MW316594	98,98%
IC	2020	Dpto. Las Colonias	Muerte perinatal	1b	MW290532	96,79%
N.T-2020	2020	Dpto. Las Colonias	Natimorto	1b	MW290533	96,88%
S.2-2020	2020	Dpto. San Cristóbal	Enfermedad de las mucosas	1b	MW290534	99,36%
CD22	2022	Dpto. San Cristobal	Malformación	1b	OQ281451	98,37%
L3	2022	Dpto. San Cristobal	Infección inaparente	1b	OQ281452	96,57%
PA1	2022	Dpto. Las Colonias	Enfermedad de las mucosas	2b	OQ281453	92,38%
SA1	2022	Dpto. Las Colonias	Enfermedad de las mucosas	1b	OQ281454	97,95%

Referencias. % Homología: porcentaje de homología respecto a la secuencia de las cepas de referencia del *GenBank* para cada genotipo

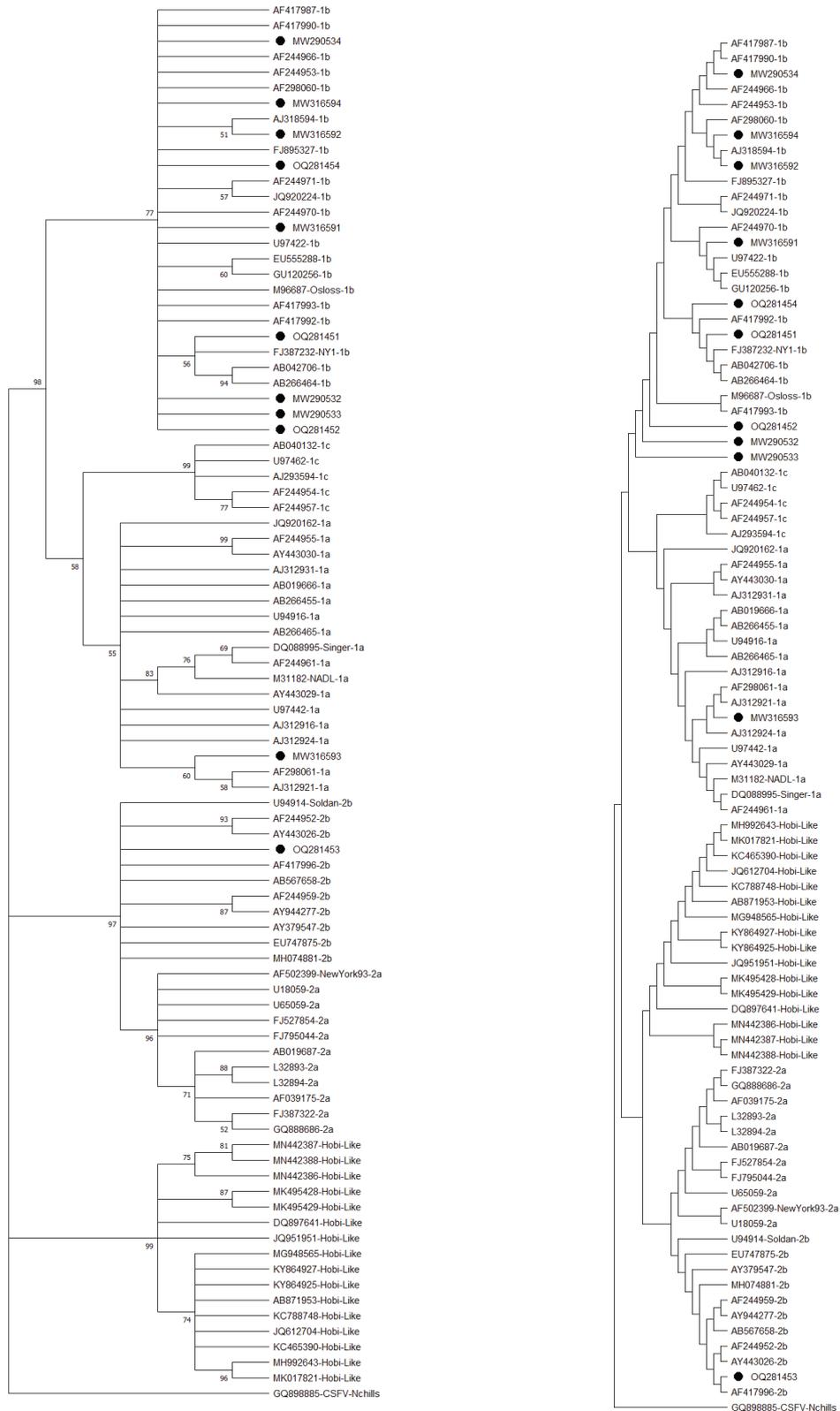


Figura 7. Árboles filogenéticos que incluyen las cepas de los genotipos 1a, 1b, 1c, 2a, 2b y Virus HoBi-Like, identificadas por su nro. de acceso a *GenBank* y las cepas secuenciadas en el presente trabajo. Los puntos negros indican las cepas que fueron secuenciadas en el presente trabajo. Izquierda: Método Neighbor Joining con 1000 bootstraps (los porcentajes de bootstraps menores a 50 fueron omitidos). Derecha: Método Neighbor Joining utilizando Maximum composite likelihood.

6. DISCUSIÓN

6. Discusión

La RT-qPCR desarrollada permitió detectar ARN viral de todos los genotipos de VDVB evaluados y mostró gran especificidad, ya que no se amplificó ácido nucleico de ninguno de los agentes patógenos bovinos evaluados de los complejos respiratorio y reproductivo bovino. Una gran ventaja de la técnica es la posibilidad de detectar ARN de virus HoBi-like, lo que puede ser útil en áreas donde éstos circulan junto a VDVB-1 y 2. En Argentina, se ha detectado la circulación de virus HoBi-like en casos de enfermedad respiratoria en bovinos de la provincia de Córdoba (Margineda et al., 2022), en búfalos del Noreste (Chaco, Formosa y Corrientes) (Pecora et al., 2017) y en suero fetal bovino proveniente de la provincia de Buenos Aires (Pecora et al., 2019). Por otro lado, se observó 100% de concordancia entre los resultados de la RT-qPCR y el aislamiento viral en las muestras clínicas testeadas. En sueros *pool*eados, la técnica permitió detectar un positivo entre 30 muestras individuales, lo cual es una ventaja importante cuando se planea llevar a cabo un programa de saneamiento en rodeos con baja prevalencia de DVB, ya que permite reducir el número de ensayos a realizar. Sin embargo, en rodeos con alta prevalencia y si el tamaño del *pool* es grande, existe mayor posibilidad de obtener mayor cantidad de *poles* positivos, requiriendo un testeo adicional para identificar los individuos virémicos (Muñoz-Zanzi et al., 2000). Por tal motivo, se debe considerar una estimación de la prevalencia cuando se utiliza la estrategia de *pool*eo de muestras, especialmente en regiones con alta prevalencia de DVB (Smith et al., 2008). Sumado a esto, la dilución de una muestra positiva que ocurre cuando el *pool* contiene un gran número de muestras individuales, podría generar resultados falsos negativos.

Debido al sistema de detección SYBR Green, la RT-qPCR desarrollada presenta algunas ventajas: es sensible, fácil de realizar y económica. Sin embargo, es importante reconocer la posible presencia de ADN doble cadena generados por dímeros de *primers*. El análisis de rutina posterior a la amplificación implica la evaluación de las curvas de temperaturas de *melting*, lo que permite discriminar el amplicón esperado de los productos de dímeros de *primers* (Ririe et al., 1997). Además, el uso de mastermixes “*One-step*” para las reacciones de un solo paso de retrotranscripción y PCR, reduce los costos, el tiempo de realización y las posibilidades de contaminación del ensayo.

Para la detección del VDVB, los laboratorios de diagnóstico utilizan frecuentemente como muestra sangre o suero bovino. Teniendo en cuenta la practicidad del uso de papeles de filtro durante la toma de muestra a campo, la sangre entera resulta más conveniente que el suero, debido a que se evita el paso de centrifugación para obtenerlo. Por tal motivo, en la presente tesis se evaluó la recuperación de ARN viral de muestras de sangre entera. A pesar de que el

semen no se utiliza como muestra de elección para el diagnóstico de rutina, es una muestra útil para el control de machos en cabañas que comercializan semen (Givens et al., 2003). En el presente plan de tesis, se evaluó la metodología de detección de ARN viral de VDVB en pajuelas de semen obteniendo resultados poco satisfactorios, ya que se evaluaron distintas condiciones de elución sin obtener repetitividad en los ensayos ni lograr almacenar ARN viral en muestras sembradas en dos tipos de papales por largos o cortos periodos de tiempo. Un estudio previo sobre HVB, reportó problemas similares en la recuperación de ADN del virus a partir semen sembrado en tarjetas FTA, por lo que los autores propusieron un nuevo protocolo, utilizando DTT (Sarangi et al., 2018). Aun así, el proceso de purificación de ARN suele ser más complejo que el de ADN (Skonieczna et al., 2016) y debido a la dificultad inherente de su preservación, este protocolo tampoco otorgó resultados satisfactorios en nuestros experimentos. La dilución del semen cuando se preparan pajuelas también puede ser un factor determinante. Puede disminuir la concentración viral de la muestra pura y, por tanto, dificultar la detección y amplificación del fragmento *target*. Además, las sustancias utilizadas para diluir semen al preparar las pajuelas que varían de acuerdo al protocolo utilizado en cada cabaña (Ugur et al., 2019), sumado a la variación individual de la composición del semen de cada toro (concentración de iones Na, K, Cl, fructosa, glicerofosforilcolina), podrían dificultar la estandarización de esta metodología para este tipo de matriz. Asimismo, se ha descrito que algunos componentes utilizados para la dilución de semen (tris, yema de huevo, glicerol, lecitina de soja, leche desnatada, antioxidantes) podrían inhibir la actividad de la polimerasa cuando se lleva a cabo la PCR (Hedman y Rådström, 2013; Rodas et al., 1996).

En cuanto a la literatura citada sobre la conservación de ARN de pestivirus bovinos en papeles de filtro, se describe el uso de varios tipos de papeles para preservar ARN por hasta 6 meses en sangre y suero de animales PI a temperatura ambiente, 4°C y -18°C (Vilcek et al., 2001). En ese estudio, los autores evaluaron cuatro tipos de papeles: papeles de filtro clásicos, papel Whatman No. 1, membranas de nitrocelulosa y membranas de nylon HYBONDTM-M. Los resultados fueron similares para todos los papeles analizados, excepto por el papel de filtro clásico, que arrojó menor cantidad de productos de PCR. Los autores utilizaron un ensayo de PCR de punto final y la extracción de ARN fue realizada directamente a partir del papel, evitando el paso de elución. En los experimentos realizados en esta tesis, este protocolo no arrojó resultados satisfactorios. Otro de los estudios que reportaron la utilización de tarjetas FTA para la detección de varios agentes involucrados en el complejo respiratorio bovino, incluido el VDVB, comparó la recuperación de ARN viral a partir de hisopados del tracto respiratorio fijados en tarjetas FTA y almacenados por 14 días a temperaturas de -27°C a 46°C, con muestras frescas enviadas en medio de transporte, observando una total concordancia en la detección de ARN

(Liang et al., 2014). A diferencia del estudio anterior, los investigadores utilizaron un ensayo de qPCR y un protocolo de elución previo a la extracción de ARN. Finalmente, se describe el uso de tarjetas FTA para muestras de hisopados nasales y sangre de animales PI con procesamiento inmediato (sin considerar distintos tiempos de almacenamiento). En este artículo, los autores compararon la detección de ARN en muestras de tarjetas FTA y muestras frescas y observaron total concordancia entre ambas, aunque con un aumento de un logaritmo en los valores de CT de las muestras sembradas en tarjetas FTA respecto de las muestras frescas (Foster et al., 2014).

De acuerdo a los resultados obtenidos de la recuperación de ARN viral de muestras de sangre sembradas en papeles, el papel cromatográfico representa una alternativa útil y económica para la toma y remisión de muestras de sangre para el diagnóstico de DVB. Sin embargo, para mayores periodos de almacenamiento (6 y 12 meses), los porcentajes de recuperación disminuyen, aunque el ARN aún pudo ser detectado, lo que significa que no sería aconsejable almacenar ARN por más de 12 meses mediante los protocolos y a las temperaturas evaluadas. Sumado a esto, el ARN viral recuperado de sangre de animales PI almacenada en papel cromatográfico sugiere que, aunque el porcentaje de recuperación disminuye a medida que el tiempo de almacenamiento aumenta, aún es posible detectar ácido nucleico viral en sangre sembrada en papeles y almacenada por 12 meses a temperatura de refrigeración.

Resulta importante tener en cuenta que se trabajó con títulos virales correspondientes a los informados en animales PI en la bibliografía y que las concentraciones virales encontradas en distintos animales en la naturaleza son variantes, por ejemplo, los que presentan infección transitoria suelen tener títulos virales más bajos que los animales PI, con lo cual, el poder de detección de la metodología estudiada variará de acuerdo a la carga viral del individuo analizado y al tiempo y temperatura de almacenamiento de la muestra en papeles.

Las tarjetas FTA contienen agentes quelantes y radicales libres y están diseñadas para evitar contaminantes ambientales y proteger los ácidos nucleicos de la muestra sembrada por al menos 6 años a temperatura ambiente (Ahmed et al., 2011). Pese a ello, en este trabajo, el papel cromatográfico – que carece de estos componentes- arrojó resultados similares a los de las tarjetas FTA. Aún más, para 12 meses de almacenamiento, si se consideran el número de repeticiones positivas, las gotas sembradas en papel cromatográfico mostraron una tendencia a una mayor recuperación en comparación con las tarjetas FTA, aunque las diferencias no fueron significativas.

Si bien la realización de un estudio económico comparativo no fue un objetivo de este trabajo de tesis, resulta importante mencionar su costo entre las ventajas del uso de papel cromatográfico para la toma y remisión de muestras al laboratorio. Cada hoja de papel cromatográfico permite sembrar aproximadamente 25 gotas de distintas muestras, con un valor

aproximado de \$USD 66,55 por cada 100 hojas (dependiendo del proveedor). En contraposición, en cada tarjeta FTA solo pueden sembrarse 4 gotas de muestra, con un costo aproximado de \$USD 308 por 25 tarjetas (dependiendo del proveedor).

Si bien aún resta avanzar con el desarrollo y validación del ELISA anti NS3, para obtener DO que permitan diferenciar sensiblemente los sueros positivos y negativos, en el presente trabajo se realizó un importante progreso en el desarrollo del mismo. Sin embargo, de las técnicas desarrolladas en esta tesis, el valor diagnóstico de la técnica de ELISA para detección de anticuerpos en una región en la que la DVB es endémica, es el más cuestionable, puesto que un gran porcentaje de animales son seropositivos; y el hecho de hallar anticuerpos en suero, no necesariamente indica enfermedad. A pesar de que este objetivo no fue concluido, se pudo obtener información sobre la prevalencia de la Diarrea Viral Bovina en establecimientos lecheros de la provincia de Santa Fe (objetivo 1.2) a través de un muestreo de leche de tanque de establecimientos que remiten su producción a una industria láctea regional, generando información valiosa y actualizada para la toma de decisiones para el monitoreo de la enfermedad en la provincia de Santa Fe. Como se mencionó anteriormente, hasta el momento de la realización de este punto, no se contaba con datos sobre la prevalencia de la Diarrea Viral Bovina en rodeos lecheros y de carne de nuestra provincia.

Con respecto a lo anterior, si bien se realizó un muestreo BTM por conveniencia, el muestreo realizado se asemeja a la frecuencia de distribución de rodeos lecheros en nuestra provincia, donde el 80% de los bovinos de leche se encuentran sobre todo en los departamentos de San Cristóbal, Castellanos, Las Colonias y San Martín (Fuente: Bolsa de Comercio de Rosario, 2018). Los resultados obtenidos a partir del ELISA anti-NS3 reflejan la importante circulación del VDVB en rodeos de la cuenca lechera de nuestra provincia, donde sólo dos establecimientos de los 262 analizados resultaron libres de circulación viral, ubicados en departamentos del centro-sur de Santa Fe.

Respecto al objetivo de saneamiento, a la hora de realizarlo, encontramos algunos inconvenientes. Primero, resulta difícil contar con establecimientos dispuestos a eliminar los animales PI, ya que muchos de ellos se encuentran enmarcados en planes de control obligatorios de otras enfermedades que requieren de la segregación de animales y la DVB no representa una prioridad de momento. Por lo tanto, uno de los aspectos principales que se tuvo en cuenta para la selección del establecimiento fue la predisposición de los encargados y personal del mismo para colaborar en este estudio.

En el establecimiento donde se realizó el monitoreo, los bovinos de leche conviven y comparten instalaciones con bovinos de carne y bubalinos. Si bien se obtuvo suero de todos los

bovinos (tanto de leche como de carne), el establecimiento no cuenta con instalaciones apropiadas para el muestreo de bubalinos, por tanto, éstos no pudieron ser testeados. A pesar de ello, ninguno de los animales muestreados resultó ser virémico, lo que indicaría que entre la población de bubalinos, tampoco circularía el virus al momento del muestreo, sin embargo, resulta necesario el testeo de estos animales para confirmar esta aseveración.

A pesar de que no pudo encontrarse circulación viral en los bovinos del establecimiento muestreado- y por tanto se realizó un monitoreo en vez del saneamiento-, el trabajo realizado resultó útil para conocer el status sanitario frente a la DVB en ese rodeo y para implementar las medidas de bioseguridad para evitar la introducción del virus.

En este objetivo, la estrategia de testeo en *pool*es resultó muy conveniente, puesto que se testearon un total de 261 animales sólo con 28 reacciones de RT-qPCR, lo cual permite una importante reducción en los costos de los análisis, si se compara con el costo del testeo de muestras individuales. Sin embargo, en caso de detectar *pool*es positivos, éstos deben abrirse para testear cada suero individualmente, lo que no ocurrió en el establecimiento estudiado. Teniendo en cuenta esto, resulta útil testear a los animales para confirmar/descartar el *status* de PI, ya que este tipo de análisis se hace una sola vez en la vida del animal para eliminar los bovinos que representan una fuente de infección para el rodeo, a diferencia de otras enfermedades de control obligatorio que requieren testeos periódicos, como la brucelosis y tuberculosis.

Por último, los resultados obtenidos a partir del estudio filogenético realizado sobre las 11 muestras positivas de la provincia, revelan datos similares a lo observado a nivel país, donde se encuentran con más frecuencia cepas de genotipo 1b, seguido por 1a y en menor proporción el genotipo 2 (Spetter et al., 2020). En un estudio realizado en 2014 se observó que, en la provincia de Buenos Aires, la mayoría de las cepas secuenciadas pertenecen al genotipo 1b (Pecora et al., 2014). Más recientemente, se han secuenciado cepas de 1e, 1i y 1j (Spetter et al., 2021b) y virus HoBi-like en la provincia de Córdoba (Margineda et al., 2022; Pecora et al., 2019). El conocimiento de la variabilidad del VDVB resulta útil para el desarrollo de técnicas diagnósticas, la evaluación de la eficacia de los programas de control y, sobre todo, a la hora de desarrollar vacunas que incluyan las cepas circulantes de cada región. En este sentido, se ha reportado que los anticuerpos producidos como respuesta a las cepas vacunales podrían tener bajo nivel de protección frente a cepas aisladas a campo debido a diferencias en su antigenicidad y por la variabilidad genética de las distintas cepas (Mosena et al., 2023). Se conoce que la mayoría de las vacunas inactivadas están desarrolladas a partir del genotipo 1a (Newcomer et al., 2017), sin embargo, en el relevamiento de la provincia de Santa Fe realizado en esta tesis, como en trabajos anteriores realizados a nivel país, las cepas que circulan con mayor frecuencia

pertenecen al genotipo 1b. Por tal motivo, resulta imprescindible incluirlas en las formulaciones de las vacunas inactivadas, para el desarrollo de inmunógenos que sean eficaces en la prevención de la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

7. Conclusiones

Este trabajo incluyó la validación de una RT-qPCR *in-house* que puede reemplazar los kits comerciales disponibles, que representan un gran costo de importación en nuestro país y puede ser útil para laboratorios de diagnóstico veterinario equipados con la infraestructura para realizar ensayos de qPCR. La RT-qPCR desarrollada se encuentra actualmente en uso en el laboratorio del IVIT-CICVyA, INTA Castelar y se utiliza para el control obligatorio de semen de exportación.

La posibilidad de almacenar ácido nucleico viral en papeles de filtro constituye un progreso en la práctica veterinaria. La oportunidad de tomar muestras directamente en los papeles de filtro en rodeos donde se sospecha de la enfermedad puede ser muy provechosa, ya que, en este tipo de matriz, las muestras no requieren envío refrigerado, ni procesamiento inmediato. Sumado a esto, las muestras son seguras para ser enviadas por correo postal debido a las sustancias químicas que contienen que son capaces de inactivar agentes microbianos. Adicionalmente, es ideal para realizar estudios moleculares, ya que la metodología garantiza la estabilidad de los ácidos nucleicos en un amplio rango de temperaturas y permite su uso con una amplia variedad de muestras distintas. Si comparamos con los métodos tradicionales de toma, remisión y almacenamiento de muestras, la tecnología de los papeles de filtro representa una importante mejora especialmente en países extensos con pobre infraestructura para el envío de muestras y, sobre todo, en países que carecen de laboratorios con capacidad para realizar ensayos moleculares en cada provincia o estado. Por otra parte, el procesamiento de las muestras sembradas en papeles de filtro en el laboratorio, requiere un procesamiento adicional muy sencillo de media hora que no representa inconvenientes ni retrasa el trabajo en comparación con el procesamiento de muestras frescas, ya que una vez eluída la muestra, el procesamiento es el mismo. Una recomendación importante a la hora de recolectar las muestras, es permitirles secar a temperatura ambiente por al menos 4 horas, dependiendo de la humedad ambiente, y enviarlas al laboratorio en bolsas individuales que incluyan un disecante como el silica gel. Es necesario continuar con el estudio de esta metodología aplicada a otros agentes infecciosos, especialmente aquellos vinculados con la salud bovina, sobre todo aquellos que requieren de control obligatorio o son económicamente relevantes para la producción local.

En esta tesis se demuestra que un papel de filtro económico, como el papel cromatográfico, es una alternativa apropiada para la recolección, envío y almacenamiento de muestras de sangre para el diagnóstico de la DVB, otorgando resultados tan buenos como los dados por tarjetas especializadas como las FTA. Lo anterior es válido siempre y cuando se acompañe con un método de detección altamente sensible como la RT-qPCR desarrollada.

Las metodologías puestas a punto en este trabajo mejoran y facilitan las opciones diagnósticas de la DVB en nuestra región y demuestran que es económicamente factible realizar el saneamiento de los establecimientos, siempre y cuando los esfuerzos sean en conjunto (regionales o nacionales), para de esta manera, evitar las reintroducciones del VDVB que puedan darse debido a descuidos o falta de aplicación de medidas de bioseguridad, sobre todo en rodeos abiertos.

Mediante el trabajo realizado, se logró obtener datos actualizados de la DVB en la provincia de Santa Fe, que a la fecha son escasos pero muy necesarios. Se pudo realizar una estimación, a través de un muestreo de conveniencia, de la prevalencia de la enfermedad en rodeos de la cuenca lechera de la provincia, indicando una alta circulación del virus en la región y la necesidad de implementar planes de control. Sumado a esto, mediante un estudio filogenético, fue posible conocer qué genotipos circulan en nuestra zona con más frecuencia y compararlos con genotipos hallados en otras regiones y en las vacunas comerciales.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

- Ahmed, H.A., MacLeod, E.T., Hide, G., Welburn, S.C., Picozzi, K., 2011. The best practice for preparation of samples from FTA® cards for diagnosis of blood borne infections using African trypanosomes as a model system. *Parasit Vectors* 4, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-68>
- Akagami, M., Takayasu, M., Ooya, S., Kashima, Y., Tsuzuku, S., Ootani, Y., Ouchi, Y., Hayama, Y., 2020. Screening of persistently infected cattle with bovine viral diarrhoea virus on dairy farms by using milk tanker and bulk tank milk samples for viral RNA and viral-specific antibody detection. *Journal of Veterinary Medical Science* 82, 607–614. <https://doi.org/10.1292/JVMS.19-0634>
- Almeida, L.L., Miranda, I.C.S., Hein, H.E., Neto, W.S., Costa, E.F., Marks, F.S., Rodenbusch, C.R., Canal, C.W., Corbellini, L.G., 2013. Herd-level risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. *Res Vet Sci* 95, 901–907. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.08.009>
- Alocilla, O.A., Monti, G., 2022. Bovine Viral Diarrhoea Virus within and herd prevalence on pasture-based dairy systems, in southern Chile dairy farms. *Prev Vet Med* 198, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105533>
- Antos, A., Miroslaw, P., Rola, J., Polak, M.P., 2021. Vaccination Failure in Eradication and Control Programs for Bovine Viral Diarrhoea Infection. *Front Vet Sci* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.688911>
- Azbel-Jackson, L., Heffernan, C., Gunn, G., Brownlie, J., 2018. Exploring the role of voluntary disease schemes on UK farmer bio-security behaviours: Findings from the Norfolk-Suffolk Bovine Viral Diarrhoea control scheme. *PLoS One* 13, 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179877>
- Baker, J.C., 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 425-445. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30460-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30460-6)
- Beaudeau, F., Assié, S., Seegers, H., Belloc, C., Sellal, E., Joly, A., 2001. Assessing the within-herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk. *Vet Rec* 149, 236–240. <https://doi.org/10.1136/vr.149.8.236>
- Bhatia, S., Sood, R., Mishra, N., Pattnaik, B., Pradhan, H.K., 2008. Development and evaluation of a MAbs based competitive-ELISA using helicase domain of NS3 protein for sero-diagnosis

- of bovine viral diarrhea in cattle and buffaloes. *Research in Veterinary Science* 85, 39–45.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.09.013>
- Bolin, S.R., McClurkin, A.W., Coria, M.F., 1985. Frequency of persistent bovine viral diarrhea virus infection in selected cattle herds. *Am J Vet Res* 46, 2385-2387.
- Brock, K. V., Grooms, D.L., Ridpath, J., Bolin, S.R., 1998. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10, 22–26. <https://doi.org/10.1177/104063879801000105>
- Brodersen, B.W., 2014. Bovine Viral Diarrhea Virus Infections: Manifestations of Infection and Recent Advances in Understanding Pathogenesis and Control. *Vet Pathol* 51, 453–464.
<https://doi.org/10.1177/0300985813520250>
- Carbonero, A., Maldonado, A., Perea, A., García-Bocanegra, I., Borge, C., Torralbo, A., Arenas-Montes, Arenas-Casas, 2011. Risk factors against bovine respiratory disease in suckling calves from Argentina. *Arch Zootec* 60, 41-51.
- Cardona-Ospina, J.A., Villalba-Miranda, M.F., Palechor-Ocampo, L.A., Mancilla, L.I., Sepúlveda-Arias, J.C., 2019. A systematic review of FTA cards[®] as a tool for viral RNA preservation in fieldwork: Are they safe and effective? *Prev Vet Med* 172, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104772>
- Caro, M.R., Ridpath, J.F., Maldonado-Estrada, J.G., Decaro, N., 2020. HoBi-Like Pestivirus and Reproductive Disorders. *Front Vet Sci* 7, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.622447>
- Castelli, M. 1998. Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Diarrea Viral Bovina: porcentaje de reactores en rodeos lecheros del centro de Santa Fe. *Revista Productores*.
http://rafaela.inta.gov.ar/productores97_98/p93.htm
- Castrucci, G., Frigeri, F., Osburn, B.I., Ferrari, M., Sawyer, M.M., Aldrovandi, V., 1991. A study of some pathogenetic aspects of bovine viral diarrhea virus infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 13, 41-49. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9153-8_12
- Charleston, B., Fray, M.D., Baigent, S., Carr, B. V., Morrison, W.I., 2001. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *Journal of General Virology* 82, 1893-1897.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1893>
- Chase, C.C.L., Elmowalid, G., Yousif, A.A.A., 2004. The immune response to bovine viral diarrhea virus: A constantly changing picture. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 20, 95-114. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.004>

- Corapi, W. V., Elliott, R.D., French, T.W., Arthur, D.G., Bezek, D.M., Dubovi, E.J., 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. *J Am Vet Med Assoc* 15, 590-596.
- Decaro, N., Losurdo, M., Lucente, M.S., Sciarretta, R., Mari, V., Larocca, V., Elia, G., Cavaliere, N., Martella, V., Fasanella, A., Buonavoglia, C., 2013. Persistent infection caused by Hobi-like pestivirus. *J Clin Microbiol* 51, 1241–3. <https://doi.org/10.1128/JCM.03134-12>
- Decaro, N., Mari, V., Stella, M., Sciarretta, R., Moreno, A., Armenise, C., Losurdo, M., Camero, M., Lorusso, E., Cordioli, P., 2012. Experimental infection of cattle, sheep and pigs with 'Hobi' -like pestivirus. *Vet Microbiol* 155, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.030>
- Deregt, D., Dubovi, E.J., Jolley, M.E., Nguyen, P., Burton, K.M., Gilbert, S.A., 2005. Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol* 108, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.02.010>
- Dubovi, E.J., 2013. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals* 41, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.06.004>
- Duffell, S., Harkness, J., 1985. Bovine virus diarrhea-mucosal disease infection in cattle. *Veterinary Record* 117, 240–245. <https://doi.org/10.1136/vr.117.10.240>
- Eiras, C., Arnaiz, I., Sanjuán, M.L., Yus, E., Diéguez, F.J., 2012. Bovine viral diarrhea virus: Correlation between herd seroprevalence and bulk tank milk antibody levels using 4 commercial immunoassays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 549–553. <https://doi.org/10.1177/1040638712440984>
- Ellis, J.A., Davis, W.C., Belden, E.L., Pratt, D.L., 1988. Flow cytofluorimetric analysis of lymphocyte subset alterations in cattle infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet Pathol* 25, 231-236. <https://doi.org/10.1177/030098588802500308>
- Evans, C.A., Reichel, M.P., 2021. Non-bovine species and the risk to effective control of bovine viral diarrhea (BVD) in cattle. *Pathogens* 10, 1–17. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101263>
- Foster, C., Hoar, B., Acvpm, D., Hessman, B.E., 2014. Evaluation of FTA cards as a sample collection method for detection of BVDV in persistently infected beef cattle. *Bov Pract* 48, 38–44.
- 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., 2003. Response of calves persistently infected with

- noncytopathic bovine viral diarrhea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and Mannheimia haemolytica bacterin-toxoid. *Vaccine* 21, 2980-2985. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00118-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00118-X)
- Givens, M., Heath, A., Brock, K., Brodersen, B., Carson, R., Stringfellow, D., 2003. Detection of bovine viral diarrhea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *Am J Vet Res* 64, 428-434.
- Givens, M.D., Heath, A.M., Brock, K. V., Brodersen, B.W., Carson, R.L., Stringfellow, D.A., 2003. Detection of bovine viral diarrhea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *Am J Vet Res* 64, 428-434. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.428>
- Givens, M.D., Newcomer, B.W., 2015. Perspective on BVDV control programs. *Anim Health Res Rev* 16, 78-82. <https://doi.org/10.1017/S1466252315000043>
- Givens, M.D., Riddell, K.P., Edmondson, M.A., Walz, P.H., Gard, J.A., Zhang, Y.J., Galik, P.K., Brodersen, B.W., Carson, R.L., Stringfellow, D.A., 2009. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol* 139, 42–51. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2009.04.029>
- Glew, E.J., Howard, C.J., 2001. Antigen-presenting cells from calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus, a member of the Flaviviridae, are not compromised in their ability to present viral antigen. *Journal of General Virology* 82, 1677-1685. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-7-1677>
- Goyal, S.M., Bouljihad, M., Haugerud, S., Ridpath, J.F., 2002. Isolation of bovine viral diarrhea virus from an alpaca. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4, 523-525. <https://doi.org/10.1177/104063870201400616>
- Goyal, S.M., Ridpath, J.F., 2005. *Bovine Viral Diarrhea Virus Diagnosis, Management, and Control*. Blackwell Publishing. 1° Edición, Iowa, USA.
- Grooms, D.L., 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 20, 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.006>
- Hedman, J., Rådström, P., 2013. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. *Methods in Molecular Biology* 943, 17–48. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_2
- Houe, H., 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31, 137–143. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00030-7)

- 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. <https://doi.org/10.1177/104063870601800501>
- Ivanovaa, S., Angelovab, S., Golkocheva-Markovac, E., Genova-Kaloud, E., Pavlova, A., Georgieva, I., 2017. A Review on Dried Blood Spots (DBS) as Alternative, Archival Material for Detection of Viral Agents (Measles, Mumps, Rubella, Hepatitis B Virus). *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)* 30, 161–172.
- Kameyama, K., Sakoda, Y., Tamai, K., Igarashi, H., Tajima, M., Mochizuki, T., Namba, Y., Kida, H., 2006. Development of an immunochromatographic test kit for rapid detection of bovine viral diarrhoea virus antigen. *J Virol Methods* 138, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.005>
- Kennedy, J.A., 2006. Diagnostic efficacy of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to screen cattle for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. *J Am Vet Med Assoc* 229, 1472–1474. <https://doi.org/10.2460/javma.229.9.1472>
- Kirkland, P., 2018. Manual Terrestre de la OIE - Capítulo 3.4.7 - Diarrea viral bovina.
- Kirkland, P., Richards, S., Rothwell, J., Stanley, D., 1991. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Veterinary Record* 128, 587–590. <https://doi.org/10.1136/vr.128.25.587>
- Lanyon, S.R., Hill, F.I., Reichel, M.P., Brownlie, J., 2014. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *The Veterinary Journal* 199, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>
- Larghi, M., 2018. Comparative study in the control of bovine viral diarrhoea. *Anim Health Res Rev* 19, 125–133. <https://doi.org/10.1017/S1466252318000129>
- Laureyns, J., 2017. What are the monetary losses by BVDV infection and is control cost-effective? *Veterinary Journal* 223, 32–33. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.05.002>
- Liang, X., Chigerwe, M., Hietala, S.K., Crossley, B.M., 2014. Evaluation of Fast Technology Analysis (FTA) Cards as an improved method for specimen collection and shipment targeting viruses associated with Bovine Respiratory Disease Complex. *J Virol Methods* 202, 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.022>

- Lindberg, A., Brownlie, J., Gunn, G.J., Houe, H., Moennig, V., Saatkamp, H.W., Sandvik, T., Valle, P.S., 2006. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: Today and in the future. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 25, 961–979. <https://doi.org/10.20506/rst.25.3.1703>
- Lindberg, A., Houe, H., 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control, in: *Preventive Veterinary Medicine* 72, 55–73. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.07.018>
- MacLachlan, N.J., Dubovi, E., 2017. Flaviviridae, in: MacLachlan, N.J., Dubovi, E. (Eds.), *Fenner's Veterinary Virology*. Academic Press, pp. 525–545. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00029-5>
- Mahmoodi, P., Reza, M., Abad, S., Ghorbanpour, M., 2015. Simple Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Antibodies Against Bovine Viral Diarrhoea Virus, Based on Prokaryotically Expressed Recombinant MBP-NS3. *Protein* 8, 0–4. <https://doi.org/10.5812/jjm.14311>
- Makoschey, B., Sonnemans, D., Bielsa, J.M., Franken, P., Mars, M., Santos, L., Álvarez, 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. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.110>
- Margineda, C.A., Ferreyra, F.M., Masnyj, F., Audrito, M., Favaro, P.M., María José, D.S., Pecora, A., 2022. HoBi-like pestivirus in 2 cases of fatal respiratory disease of feedlot cattle in Argentina. *J Vet Diagn Invest* 34, 693–698. <https://doi.org/10.1177/10406387221098356>
- Maya, L., Puentes, R., Reolón, E., Acuña, P., Riet, F., Rivero, R., Cristina, J., Colina, R., 2016. Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch Virol* 161, 529–535. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2688-4>
- Meyling, A., Mikél Jensen, A., 1988. Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet Microbiol* 17, 97–105. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90001-6](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90001-6)
- Moennig, V., Becher, P., 2018. Control of Bovine Viral Diarrhoea. *Pathogens* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010029>
- Moennig, V., Yarnall, M.J., 2021. The long journey to BVD eradication. *Pathogens* 10, 1–9. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101292>
- Moerman, A., Straver, P.J., de Jong, M.C.M., Quak, J., Baanvinger, Th., van Oirschot, J.T., 1994. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: A

- longitudinal study. *Veterinary Quarterly* 16, 115–119.
<https://doi.org/10.1080/01652176.1994.9694430>
- Monteiro, F.L., Cargnelutti, J.F., Martins, B., Noll, J.G., Weiblen, R., Flores, E.F., 2019. Detection of bovine pestiviruses in sera of beef calves by a RT-PCR based on a newly designed set of pan – bovine pestivirus primers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 31, 255–258. <https://doi.org/10.1177/1040638719826299>
- Moorthy, D., Mishra, N., Kalaiyarasu, S., Jhade, S.K., Singh, V.P., 2019. Evaluation of currently available bovine viral diarrhea virus (BVDV) and HoBi-like pestivirus (HoBiPeV) specific diagnostic tests in detection of highly divergent HoBiPeVs in cattle. *J Virol Methods* 272, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113707>
- Mosena, A.C.S., Ma, H., Casas, E., Dassanayake, R.P., Canal, C.W., Neill, J.D., Falkenberg, S.M., 2023. Multivariate analysis reveals that BVDV field isolates do not show a close VN-based antigenic relationship to US vaccine strains. *BMC Res Notes* 16, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13104-023-06410-2>
- 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 diarrhea virus persistently infected cattle. *J Vet Diagn Invest.* 12, 195–203. <https://doi.org/10.1177/104063870001200301>
- Muthukrishnan, M., Singanallur, N.B., Ralla, K., Villuppanoor, S.A., 2008. Evaluation of FTA® cards as a laboratory and field sampling device for the detection of foot-and-mouth disease virus and serotyping by RT-PCR and real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 151, 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.05.020>
- Newcomer, B.W., 2021. 75 years of bovine viral diarrhea virus: Current status and future applications of the use of directed antivirals. *Antiviral Res* 196, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2021.105205>
- Newcomer, B.W., Chamorro, M.F., Walz, P.H., 2017. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol* 206, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.003>
- Nugroho, W., Juniarti, R., Silitonga, P., Reichel, M.P., Irianingsih, H., Wicaksono, M.S., 2022. The Epidemiology and Control of Bovine Viral Diarrhea Virus in Tropical Indonesian Cattle. *Pathogens* 11, 1–19. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020215>
- Odeón, A.C., González Altamiranda, E., Goizueta, M., Verna, A., Louge Uriarte, E., Spetter, M., Spath, E., Castellano, A., Odriozola, E., Cantón, G., Fernández, J., Finelli, J., Pereyra, S., Leunda, M., Recalt, V., Capozzo, A., Malacari, D., 2015. Valorización económica de la

implementación de una estrategia sanitaria de control del virus de la Diarrea Viral Bovina en un establecimiento de. *Motivar*, Edición N° 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. *Vet Microbiol* 96, 133–144. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00210-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00210-4)

Pecora, A., Malacari, D., Pérez Aguirreburualde, M.S., Bellido, D., Núñez, M.C., Dus Santos, M.J., Escribano, J.M., Wigdorovitz, A., 2015. Development of an APC-targeted multivalent E2-based vaccine against Bovine Viral Diarrhoea Virus types 1 and 2. *Vaccine* 33, 5163–5171. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.106>

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. *Res Vet Sci* 96, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.004>

Pecora, A., Pérez Aguirreburualde, M.S., Malacari, D., Zabal, O., Bauermann, F. V, Ridpath, J.F., Dus Santos, M.J., 2016. Pestivirus emergentes HoBi: impacto en salud animal y su importancia como contaminante de insumos biotecnológicos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 42, 252–257. <https://doi.org/10.1128/JCM.01563-14>

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. <https://doi.org/10.1177/1040638717720246>

Pecora, A., Perez 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, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00359>

Perozo, F., Villegas, P., Estevez, C., Alvarado, I., Purvis, L.B., 2006. Use of FTA® filter paper for the molecular detection of Newcastle disease virus. *Avian Pathology* 35:2, 93–98. <https://doi.org/10.1080/03079450600597410>

Peterhans, E., Jungi, T.W., Schweizer, M., 2003. BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31, 107–112. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00024-1)

- Picard-Meyer, E., Barrat, J., Cliquet, F., 2007. Use of filter paper (FTA[®]) technology for sampling, recovery and molecular characterization of rabies viruses. *J Virol Methods* 140, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.011>
- Pinheiro de Oliveira, T.F., Fonseca, A.Ô.A., Camargos, M.F., de Oliveira, A.M., Pinto Cottorello, A.C., Souza, A. dos R., de Almeida, I.G., Heinemann, M.B., 2013. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals* 41, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.08.005>
- Pope, B., Kent, H.M., 1996. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Research* 24, 536-537.
- Potgieter, L.N., 1997. Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13, 471–481. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30309-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30309-1)
- Radostits, O.M., Littlejohns, I.R., 1988. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. *Can Vet J* 29, 513–528.
- Radwan, G.S., Brock, K. V, Hogan, J.S., Smith, K.L., 1995. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* 44, 77-92.
- Raue, R., Harmeyer, S.S., Nanjiani, I.A., 2011. Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: Assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. *Veterinary Journal* 187, 330–334. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.12.013>
- Reichel, M., Hill, F., Voges, H., 2008. Does control of bovine viral diarrhoea infection make economic sense? *N Z Vet J* 56, 60–66. <https://doi.org/10.1080/00480169.2008.36809>
- Renshaw, R.W., Ray, R., Dubovi, E.J., 2000. Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 184–186. <https://doi.org/10.1177/104063870001200219>
- Revell, S., Chasey, D., Drew, T., Edwards, S., 1988. Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record* 123, 122–125. <https://doi.org/10.1136/vr.123.5.122>
- Richter, V., Lebl, K., Baumgartner, W., Obritzhauser, W., Kasbohrer, A., Piniór, B., 2017. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral

- diarrhea virus infection. *Veterinary Journal* 220, 80–87.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.005>
- Ridpath, J., 2010. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26, 335–348. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.003>
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R., 1995. Delayed Onset Postvaccinal Mucosal Disease as a Result of Genetic Recombination between Genotype 1 and Genotype 2 BVDV. *Virology* 212, 259–262. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1480>
- Ridpath, J.F., Neill, J.D., 2015. Pestiviruses: Old enemies and new challenges. *Anim Health Res Rev* 16, 1–3. <https://doi.org/10.1017/S1466252315000134>
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245, 154–160. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9916>
- Robinson, T.L., Sutherland, I.A., Sutherland, J., 2007. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.09.012>
- Rodas, J., Zuluaga, F., Ossa, J., 1996. Estandarización de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del herpes virus bovino-1 (HVB-1) en semen. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 9, 44–52.
- Rondón, I., 2006. Diarrea viral bovina: patogénesis e inmunopatología. *Rev. MVZ Córdoba* 11, 694–704.
- Saliki, J.T., Dubovi, E.J., 2004. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 20, 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.005>
- Sandvik, T., 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol* 64, 123–134. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00264-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00264-8)
- Sarangi, L.N., Naveena, T., Rana, S.K., Surendra, K.S.N.L., Reddy, R.V.C., Bajjibabu, P., Ponnanna, N.M., Sharma, G.K., Srinivasan, V.A., 2018. Evaluation of a specialized filter-paper matrix for transportation of extended bovine semen to screen for bovine herpesvirus-1 by real-time PCR. *J Virol Methods* 257, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.03.009>

- Schirrmeier, H., Strebelow, G., Depner, K., Hoffmann, B., Beer, M., 2004. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *Journal of General Virology* 85, 3647–3652. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80238-0>
- Singh, E.L., Eaglesome, M.D., Thomas, F.C., Papp-Vid, G., Hare, W.C.D., 1982. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. I. The exposure of preimplantation bovine embryos to akabane, bluetongue and bovine viral diarrhoea viruses. *Theriogenology* 17, 437–444. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(82\)90025-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(82)90025-5)
- Skonieczna, K., Krenska, A., Wysocki, M., Jakubowska, A., Grzybowski, T., 2016. RNA isolation from bloodstains collected on FTA cards – application in clinical and forensic genetics. *Arch Med Sad Kryminol* 66, 244–254. <https://doi.org/10.5114/amsik.2016.66706>
- Smith, D.B., Meyers, G., Bukh, J., Gould, E.A., Monath, T., Muerhoff, A.S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Stapleton, J.T., Simmonds, P., Becher, P., 2017. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *Journal of General Virology* 98, 2106–2112. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000873>
- Smith, R.L., Sanderson, M.W., Walz, P.H., Givens, M.D., 2008. Sensitivity of polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled serum samples and use of pooled polymerase chain reaction to determine prevalence of bovine viral diarrhoea virus in auction market cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 75–78. <https://doi.org/10.1177/104063870802000115>
- Spetter, M.J., Louge Uriarte, E.L., Armendano, J.I., Álvarez, I., Norero, N.S., Storani, L., Pereyra, S.B., Verna, A.E., Odeón, A.C., González Altamiranda, E.A., 2021a. Frequency of bovine viral diarrhoea 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>
- Spetter, M.J., Louge Uriarte, E.L., Armendano, J.I., Morrell, E.L., Cantón, G.J., Verna, A.E., Dorsch, M.A., Pereyra, S.B., Odeón, A.C., Saliki, J.T., González Altamiranda, E.A., 2020. Detection methods and characterization of bovine viral diarrhoea virus in aborted fetuses and neonatal calves over a 22-year period. *Brazilian Journal of Microbiology* 51, 2077–2086. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00296-z>
- Spetter, M.J., Louge Uriarte, E.L., Verna, A.E., Leunda, M.R., Pereyra, S.B., Odeón, A.C., González Altamiranda, E.A., 2021b. Genomic diversity and phylodynamic of bovine viral diarrhoea

- virus in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution* 96, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2021.105089>
- Ståhl, K., Alenius, S., 2012. BVDV control and eradication in Europe--an update. *Jpn J Vet Res* 60, 31–39. <https://doi.org/10.14943/jjvr.63.1.15>
- Ugur, M.R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H.C., Gilmore, A.A., Hitit, M., Arifiantini, R.I., Purwantara, B., Kaya, A., Memili, E., 2019. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Front Vet Sci* 6, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Van Campen, H., 2010. Epidemiology and control of BVD in the U.S. *Vet Microbiol* 142, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.049>
- Van Campen, H., Vorpahl, P., Huzurbazar, S., Edwards, J., Cavender, J., 2000. A case report: Evidence for type 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV)-associated disease in beef herds vaccinated with a modified-live type 1 BVDV vaccine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 263–265. <https://doi.org/10.1177/104063870001200312>
- Van Duijn, L., Veldhuis, A.M.B., Mars, M.H., de Roo, B., Lam, T.J.G.M., 2019. Efficacy of a voluntary BVDV control programme: Experiences from the Netherlands. *Veterinary Journal* 245, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.12.016>
- Vargas, D., Jaime, J., Vera, V., 2009. Perspectivas para el control del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 22, 677–688.
- Vilcek, S., Strojny, L., Durkovic, B., Rossmanith, W., Paton, D., 2001. Storage of bovine viral diarrhea virus samples on filter paper and detection of viral RNA by a RT-PCR method. *J Virol Methods* 92, 19–22.
- Villaamil, F.J., Arnaiz, I., Allepuz, A., Molins, M., Lazaro, M., Benavides, B., Moya, S.J., Fabrega, J.C., Yus, E., Dieguez, F.J., 2020. A survey of biosecurity measures and serological status for bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus 1 on dairy cattle farms in north-west and north-east Spain. *Vet Rec Open* 7, 1-9. <https://doi.org/10.1136/vetreco-2020-000399>
- Voges, H., Horner, G.W., Rowe, S., Wellenberg, G.J., 1998. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viremic bull. *Vet Microbiol* 61, 165–175. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00177-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00177-1)
- Weber, M.N., Mósen, A.C.S., Simoes, S.V.D., Almeida, L.L., Pessoa, C.R.M., Budaszewski, R.F., Silva, T.R., Ridpath, J.F., Riet-Correa, F., Driemeier, D., Canal, C.W., 2016. Clinical Presentation Resembling Mucosal Disease Associated with ‘HoBi’ -like Pestivirus in a Field Outbreak. *Transbound Emerg Dis* 63, 92–100. <https://doi.org/10.1111/tbed.12223>

- Weber, M.N., Silveira, S., Machado, G., Groff, F.H.S., Mósen, A.C.S., Budaszewski, R.F., Dupont, P.M., Corbellini, L.G., Canal, C.W., 2014. High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Res* 191, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.035>
- Wernike, K., Beer, M., 2022. International proficiency trial for bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibody detection: limitations of milk serology. *BMC Vet Res* 18, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03265-w>
- Wernike, K., Gethmann, J., Schirrmeyer, H., Schroder, R., Conraths, F.J., Beer, M., 2017. Six Years (2011 – 2016) of Mandatory Nationwide Bovine Viral Diarrhoea Control in Germany — A Success Story. *Pathogens* 6, 1–8. <https://doi.org/10.3390/pathogens6040050>
- Wernike, K., Schirrmeyer, H., Strebelow, H., Beer, M., 2017. Eradication of bovine viral diarrhoea virus in Germany—Diversity of subtypes and detection of live-vaccine viruses. *Vet Microbiol* 208, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.009>
- Yarnall, M.J., Thrusfield, M. V., 2017. Engaging veterinarians and farmers in eradicating bovine viral diarrhoea: A systematic review of economic impact. *Veterinary Record* 181, 1–8. <https://doi.org/10.1136/vr.104370>
- Zimmer, G.M., Wentink, G.H., Brusckhe, C., Westenbrink, F.J., Brinkhof, J., de Goey, I., 2002. Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 89, 255–265. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00203-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00203-1)

ANEXOS

Anexo I

Tabla 1. Resultados de ensayo preliminar para selección de papeles, matrices y eluyentes.

Papel	Eluyente	SEMEN		SUERO		SANGRE	
		CT	% EFICIENCIA	CT	% EFICIENCIA	CT	% EFICIENCIA
Cromatográfico	H2O	38,18	81,64	33,20	93,89	ND	-
	Buffer TE	ND	-	36,80	84,70	*	-
	FTA Reagent	35,50	87,80	ND	-	38,16	80,53
	TRIZOL	35,10	88,80	34,00	91,68	33,30	92,28
	MEM	35,90	86,82	36,08	86,39	34,48	89,12
ALHSTROM	H2O	ND	-	29,84	70,38	32,44	64,73
	Buffer TE	ND	-	ND	-	28,00	75,00
	FTA Reagent	29,00	72,41	24,40	86,07	27,75	75,68
	TRIZOL	31,48	66,71	25,30	83,00	24,10	87,14
	MEM	28,37	74,02	ND	-	30,60	68,63
FTA WHATMAN	H2O	ND	-	29,83	70,40	*	-
	Buffer TE	31,23	67,24	29,94	70,14	ND	-
	FTA Reagent	ND	-	30,86	68,05	37,28	56,33
	TRIZOL	31,04	67,65	29,90	70,23	35,78	58,69
	MEM	31,22	67,26	28,46	73,79	34,48	89,12
SYS	H2O	37,00	84,24	35,40	88,05	34,25	89,72
	Buffer TE	37,40	83,34	37,00	84,24	36,72	83,69
	FTA Reagent	38,14	81,73	ND	-	38,51	79,80
	TRIZOL	ND	-	36,00	86,58	34,60	88,82
	MEM	35,10	88,80	ND	-	35,80	85,84

ND: no detectado

*: la muestra no atravesó la columna durante la extracción

Tabla 1. Resultados de ensayo preliminar para selección de papeles, matrices y eluyentes. Los resultados del porcentaje de eficiencia fueron calculados en base al CT (*cycle threshold*) del control positivo (muestra fresca contaminada con la misma cantidad de virus).

Anexo II

Información de establecimientos para saneamiento/monitoreo de

Diarrea Viral Bovina (DVB):

- 1) Nombre del establecimiento: **Escuela Granja**
- 2) Responsable: **Gastón**
- 3) Tipo de producción: **tambo**
- 4) Composición del rodeo:

Categoría	Nro. de animales
Crianza artificial	10 hembras, 6 machos
Recría	R1: 18 hembras y 7 machos R2: 19 hembras R3: 26 hembras
Vaquillonas	
Vacas en ordeño	93
Vacas secas	20
Machos	0

Raza: **Holando**

- 5) Reposición: ¿propia o externa? **Reposición propia**
Si la reposición es externa, ¿testean a los animales que ingresan frente a Diarrea Viral Bovina?
- 6) Servicio: ¿Servicio natural o inseminación artificial? **Se realiza I.A.**
Si realizan servicio natural, ¿testean a los toros frente a DVB?
Si realizan IA, ¿testean el semen frente a DVB? **No se testea.**
- 7) Presencia de otras especies de animales domésticos (ovinos, caprinos, búfalos, cerdos, etc):
SI – NO ¿cuáles? **Todas especies antes nombradas.**
¿Pastorean juntos o comparten agua de bebida? SI – NO: **Sólo los bubalinos pastorean y consumen agua de los mismos bebederos en ocasiones.**
Presencia de animales silvestres: SI – NO ¿cuáles? **Aves silvestres, liebres y zorros.**
- 8) Testeo para DVB: SI – NO: **Si realizamos análisis.**

Si lo hacen, ¿cuál es el test? ¿Cuándo se realiza? **Lo realizan en los laboratorios de la facultad**

9) Aparición de casos de enfermedad respiratoria, diarreas, abortos:

Aparición de casos de ...	Sí	No	Observaciones
... enfermedad respiratoria durante la crianza o recría?		No	
... enfermedad respiratoria en vacas?		No	
En Caso afirmativo, ¿se comenzó a aplicar alguna medida preventiva? ¿Cuál? (Especifique en observaciones)			Antes se vacunaba a los animales de la R1, pero hace 8 años que no se vacuna más.
... abortos con presunto diagnóstico infeccioso?	Si		
En ese caso, ¿se remitieron muestras al laboratorio? ¿Cuál fue el test utilizado y el resultado?	Si		IBR test de ELISA indirecto BVD test de ELISA por bloqueo NEOSPORA test de ELISA indirecto

10) Vacunación contra DVB (vacuna respiratoria, reproductiva, etc): SI – NO

Vacuna usada: **VIRAL REPRODUCTIVA, Laboratorio CDV**

Categoría en que se aplica: **todos los animales hembras mayores a 6 meses**

Esquema de vacunación: **cada 3 meses**

Uso de agujas individuales: **si**

11) Manejo de terneros machos: ¿hasta cuándo los mantienen en el establecimiento? ¿Están apartados del resto? **Los terneros machos se quedan hasta los 100 kilos promedio. En guachera y R1 están junto a las hembras**

12) ¿Durante las maniobras que se realizan (vacunaciones, aplicación de inyectables, sangrado), reutilizan las agujas o usan una aguja nueva por cada animal? **Se utiliza 1 aguja por animal, está práctica se realiza hace 4 años.**



ORIGINAL ARTICLE

Improvement of bovine pestiviral diagnosis by the development of a cost-effective method for detecting viral RNA in fresh specimens and samples spotted in filter papers



Paula M. Favaro^{a,*}, Ana Molineri^b, María J. Dus Santos^{c,d}, Luis F. Calvino^{a,b},
Andrea Pecora^{c,d}

^a Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

^b Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (INTA-CONICET), Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Santa Fe, Argentina

^c Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT) CICMA, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina

^d Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, Buenos Aires, Argentina

Received 16 March 2022; accepted 18 October 2022

Available online 17 January 2023

KEYWORDS

Bovine pestiviruses;
Diagnosis;
Filter papers;
RT-qPCR

Abstract Bovine pestiviruses are the causative agents of bovine viral diarrhoea, a disease that causes severe economic losses in cattle. The aim of this study was to improve their diagnosis by developing a RT-qPCR to detect bovine pestiviruses A, B and H; and to set up a protocol for collecting, shipping and preserving bovine pestiviral RNA on filter papers. The developed RT-qPCR showed high sensitivity in detecting these viruses in different matrices: viral stocks, semen and serum samples. With regard to the possibility of using the technique to test serum pools, it was possible to identify a positive serum sample within a pool containing 30 sera. In addition to evaluating the qPCR from fresh samples, the use of filter papers to save bovine samples was analyzed. The sampling method on two different filter papers using bovine blood drops was a useful alternative for diagnostic purposes and allowed to preserve pestiviral RNA for up to 12 months under refrigeration.

© 2022 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author.

E-mail address: pfavaro@fcv.unl.edu.ar (P.M. Favaro).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.10.002>

0325-7541/© 2022 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

PALABRAS CLAVE

Pestivirus bovinos;
 Diagnóstico;
 Papeles de filtro;
 RT-qPCR

Optimización del diagnóstico de Pestivirus bovinos mediante el desarrollo de una metodología económica para detectar ARN viral en muestras frescas y fijadas en papeles de filtro

Resumen Los Pestivirus bovinos son los agentes causales de la diarrea viral bovina, una enfermedad que genera importantes pérdidas económicas en el ganado vacuno. El objetivo de este trabajo fue mejorar su diagnóstico mediante el desarrollo de una RT-qPCR para detectar los Pestivirus bovinos A, B y H y diseñar un protocolo de recolección, envío y conservación de ARN viral en papeles de filtro. La RT-qPCR desarrollada demostró alta sensibilidad en la detección de estos virus en diferentes matrices: stock viral, suero y semen. Respecto de la posibilidad de usar la técnica para testear pools de suero, fue posible identificar un suero positivo dentro de un pool compuesto por 30 sueros. Además de evaluar la qPCR en muestras frescas, se analizó el uso de papeles de filtro para sembrar muestras de bovinos. La metodología de toma de muestras en dos tipos de papeles de filtro usando gotas de sangre fue una alternativa útil para el diagnóstico y permitió conservar ARN viral por hasta 12 meses a temperaturas de refrigeración. © 2022 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Bovine pestiviruses cause severe economic losses in cattle worldwide. Pestiviruses belong to the family Flaviviridae, and are single-stranded RNA viruses, classified into the genus Pestivirus, also including Pestivirus C (Classical swine fever virus) and Pestivirus D (Border disease virus)¹. Two species of bovine pestiviruses (also known as Bovine viral diarrhoea virus) are known: Pestivirus A and Pestivirus B (previously known as BVDV-1 and BVDV-2, respectively)². Two decades ago, an emerging bovine pestivirus was reported³, which was recently classified as Pestivirus H (HoB-like pestivirus)⁴. Each genotype is further classified into cytopathic (CP) and non-cytopathic (NCP) biotypes, according to their ability to cause damage in cell cultures¹.

Bovine pestiviruses can be transmitted to susceptible animals through all the secretions of an infected animal. Persistently infected animals (PI) play a fundamental role in the transmission of the virus since they are the main source of infection through their fluids to their cohabitants. They acquire the viral infection through a NCP strain that crosses the placenta during pregnancy. From days 45 to 125 of pregnancy the immune system of the fetus is not developed; therefore, it is incapable to elicit a proper immune response. Infection in this period of time leads to the development of a PI and seronegative calf⁵. Thus, PI animals spread the virus through their secretions and excretions lifelong.

Pestiviruses A, B and H are the causative agents of bovine viral diarrhoea (BVD), which includes a wide range of syndromes, such as diarrhoea, respiratory disease, reproductive failures, embryonic mortality, abortions, malformations and hemorrhagic syndromes, depending on the age of the host and the viral strain. In addition, in PI animals, bovine pestiviruses can cause a severe syndrome called mucosal disease when they are re-infected with a CP strain of the virus¹.

Identification and elimination of PI animals is essential for the control of BVD in infected herds. Furthermore,

application of biosecurity measures, such as testing all animals arriving at the herd, testing semen, avoiding the contact with neighboring herds, controlling other species that could host the virus, among others, is necessary to prevent the reintroduction of pestiviruses in the herd⁶. In some European countries, eradication of bovine pestiviruses was accomplished by applying the mentioned biosecurity measures, including or not vaccination programs⁷.

Detection of PI animals requires the use of direct diagnostic techniques. Among the available assays, viral isolation is the gold standard test; however, it is expensive and takes several days to yield results, hence, being currently disused in most diagnostic laboratories. Other techniques, such as enzyme-linked immunosorbent assays, direct immunofluorescence and immunohistochemistry, can be used to detect viral antigens. As an alternative, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative RT-PCR (RT-qPCR) detect viral RNA with high sensitivity^{8,9}. qPCR has several advantages, such as fastness, and the possibility to pool samples from different animals¹. Once the pools have been checked by RT-qPCR, if one of them is positive, it has to be split, and each sample must be tested individually. Compared with individual testing, the chance to test several animals as a pool is a great advantage in herds with low BVD prevalence, taking into account the saving of reagents and time consumed by technicians. Several strategies to pool samples according to the prevalence of BVD in herds have been proposed¹⁰. Currently, commercial *in vitro* diagnostic RT-qPCR kits are available to assure the detection of a bovine pestivirus positive animal within a pool of 50 samples; however, they may be inaccessible in some low-income countries because of their price and import constraints.

One of the critical points for molecular diagnostics is correct sample preservation. As bovine pestiviruses are very labile RNA viruses¹¹, a cold chain must be ensured to avoid erroneous results in the RT-qPCR assay; therefore, samples must be taken and sent chilled to the laboratory as soon as possible. This is an inconvenient in herds located in places

far from the diagnostic laboratories. Blood samples should be maintained at 4 °C while semen should be sent in liquid nitrogen, which represents high costs and shipping logistics. A useful alternative to improve collecting and shipping samples is filter paper (cotton-based, cellulose paper), such as the Flinders Technology Associates cards (FTA® cards), especially designed to maintain nucleic acids stable at different temperatures and to protect them from UV rays²⁵. Since microorganisms present in samples spotted onto filter papers are immediately inactivated, the FTA system is completely safe and the cards could be shipped by postal mail, at room temperature (RT). FTA cards are widely used in different areas, such as biobanking, forensic genetics and molecular epidemiology research, since they preserve nucleic acids for long time periods. They have been effective for the detection of RNA viruses (Foot-and-mouth disease virus, avian influenza virus, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Rotavirus and some arboviruses)^{2,5,10,11,22}. This technology is easy to use and non-invasive⁵, as a small volume of sample is spotted on a filter paper and venipuncture is not needed.

The aims of this study were to develop and validate a Sybr Green-based RT-qPCR test to assess detection and quantification of all bovine pestiviruses in serum and semen samples and to set up a strategy for collecting, shipping and preserving viral RNA on filter papers for BVD diagnosis and biobanking as a cost-effective method.

Materials and methods

Virus, plasmid and clinical samples

Viral strains

A CP Pestivirus B (isolate vs253) strain cultivated in Madin Darby bovine kidney cells (MDBK) available in the Virology Institute and Innovative Technologies (VIT) from the Research Center of Veterinary Sciences (CICVyA), INTA Castelar, was used as viral stock to standardize the RT-qPCR and to spike specimens in order to mimic clinical samples.

Semen and serum samples

To detect RNA from bovine sera, blood samples without anticoagulant from healthy animals (pestivirus-negative by an in-house validated RT-PCR) were collected and sent to the laboratory at 4 °C. Sera was obtained after a five minute-centrifugation at 1500 × g and then dispensed in sterile 1.5 ml tubes. The sera tubes were stored at 4 °C or at -70 °C in case the sample was not immediately processed.

To assemble pools, aliquots of the same volume of each bovine serum were mixed in a 1.5 ml tube. The volume of each serum to be used in a pool was calculated according to the size of the pool, with a final volume of 200 µl.

To detect viral RNA from semen, 250 µl straws of extended semen from healthy animals (pestivirus-negative by an in-house validated RT-PCR) were shipped in liquid nitrogen and stored at -70 °C. All samples were thawed at RT before processing.

Sample preparation

The amount of virus used to spike sera and semen straws was calculated based on expected PI animal viral titers

(10⁷ TCID50/ml) as determined by several authors^{1,16}. A titrated Pestivirus B stock was used to spike the samples.

Plasmid construction

For the qPCR standardization, a plasmid containing the pestiviral 5'untranslated region (5'UTR) of the viral genome was constructed. Partial 5'UTR of a local Pestivirus A isolate (25366) (obtained by RT-PCR) was inserted into a pGemT-easy vector (Promega, USA) following the manufacturer's recommendations. Competent *Escherichia coli* DH5-α strains were used for transformation with the ligation product. Transformation was carried out by thermal shock, following molecular biology standard methods²⁶. Plasmid was purified using the Wizard Plus SV Minipreps kit (Promega, USA) following the manufacturer's instructions. Plasmid identity was confirmed using restriction endonuclease digestion. Finally, the purification product was quantified by Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) and the number of copies was calculated.

Clinical samples

Twenty-eight (28) clinical samples collected from naturally infected animals that were confirmed positive by viral isolation in cell culture and subsequently direct immunofluorescence, were used to ensure viral RNA detection by the assay. The specimens consisted of 4 intestines, 7 fetuses, 3 nasal swabs, one ocular swab, 2 esophagus, one lung, 2 spleens and 8 blood samples (provided and diagnosed by Laboratorio Azul and Specialized Veterinary Diagnostic Service at INTA Balcarce, Argentina).

qPCR standardization

qPCR standardization was performed according to the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines⁷.

RNA extraction

RNA extraction was performed using the High Pure PCR Template Preparation kit (Roche, Switzerland) following the manufacturer's instructions. Positive and negative controls were included, consisting of 200 µl of Pestivirus B (isolate vs253) and 200 µl of elution buffer, respectively. The obtained RNA was immediately stored at -70 °C until processing.

Retro-transcription and qPCR reaction

RT-qPCR reactions were carried out simultaneously using the iTaq Universal SYBR Green One-Step Kit (Bio-Rad, USA). A 10 µl final volume mix was prepared with 5 µl of iTaq Universal SYBR Green reaction mix, 0.125 µl of iScript reverse transcriptase, 0.25 µl of forward and reverse primer (Genbiotech, Argentina), 2.625 µl of nuclease free water (Biodynamics, Argentina) and 2 µl of RNA obtained in a previous step. The cycling program consisted of 10 min at 50 °C for reverse transcription reaction, 1 min at 95 °C for polymerase activation and DNA denaturation, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C, finalizing with a 0.5 °C increment from 65 to 95 °C every 2 s, using StepOne equipment (Applied Biosystems, USA). In each assay, positive and negative controls were included.

Primer selection and concentration adjustment

Primer pairs 189–389 were used to develop the qPCR[®]. Primer sequences were 5'-AGTCGTCAR(A/G)TGGTTCGAC-3' and 5'-TCCATGTGCCATGTACA-3' for 189 (forward primer) and 389 (reverse primer), respectively and amplify a 201 bp sequence of the 5'-UTR of bovine pestivirus genome. The expected amplicon was verified using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and aligned with reference NADL strain (GenBank accession number M31182) between positions 190 and 390 of the complete sequence.

To establish the most efficient dilution of primers to set up the test, 10 folded dilutions of the plasmid were prepared and several concentrations of primers were assessed (390 nM, 420 nM, 450 nM, 470 nM, 525 nM, 535 nM and 540 nM). Primer efficiency was confirmed for each experiment using the formula: $E = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$, whereby a slope close to -3.32 indicates 100% efficiency. This ensured that PCR products were amplified at an efficient rate and experiments were comparable among them.

Analytical sensitivity and linear dynamic range of detection

Limit of detection (LOD) was calculated for the different matrices: plasmid, viral stock and spiked serum and semen. For that purpose: 10-fold dilutions were performed, from 10^9 to 10^1 copies of the plasmid (3 replicates) and from 10^8 to 10^1 copies of the viral stock, sera and semen (12 replicates). In addition, 3 replicates of pools of bovine sera containing 10, 20, 30, 40 and 50 individual samples (one serum of each pool was spiked to mimic a FI sample) were assessed in order to determine the efficiency in pooling sera. The linear range of the qPCR was established by a standard curve with 10-fold dilutions of the plasmid from 2.5 to 2 500 000 000 copies.

Assay precision

Replication experiments were carried out to test positive controls (plasmid and viral stock) and to compare cycle threshold (CT) results in order to ensure precise detection of the target sequence. CT values of 25 repetitions of viral stock and 10 repetitions of 5'UTR plasmid (processed in triplicate) were registered. Mean, standard deviation, weighted average variation coefficient (CV_{wp}) and maximum random error allowed (CV_{all}) were calculated.

Analytical specificity

Bovine respiratory syncytial virus (BRV), Bovine parainfluenza-3 (PI-3), Bovine herpesvirus-5 (BHV-5), Bovine herpesvirus-1 (BHV-1), Blue tongue virus (BTV), Bovine Rotavirus type A (RNA) and *Mycoplasma* spp. were used to evaluate the specificity of the test. In addition, several bovine pestivirus strains available at the INT, INTA Castelar, were used to check the ability of the qPCR to identify all possible viral variants that were detected in Argentina. Viral isolates and reference strains included: 13 strains of Pestivirus A (4 from sub-genotype a and 9 from sub-genotype b), 4 strains of Pestivirus B and 5 strains of Pestivirus H.

Inter-laboratory assays

DNA aliquots of plasmid and negative controls, as well as reagents and instructions to run the test were sent to three

different laboratories to perform the qPCR. Two of them were located in the INT Institute and the other one was from a private veterinary diagnostic laboratory. Involved laboratories have trained technicians and separate areas to prepare PCR mixes and sow samples. The assay was also carried out in equipment available in these laboratories: IQ5 (Bio-Rad, USA), AB7500 (Applied Biosystems, USA) and MyGo (IT-IS Life Science, Ireland) thermal cyclers.

Data analysis

Data analysis was carried out using StepOne Software version 2.3.

Filter paper sample processing**Storage of filter papers spotted with spiked blood**

Two types of filter papers were used throughout the experiments: FTA cards (Whatman, UK) and cellulose 3 mm chromatography paper (GE Healthcare, USA). Since FTA cards are designed for nucleic acid conservation over long time periods, they were used for conservation purposes. Conversely, chromatography paper, commonly used for other purposes and less expensive than the former, was evaluated for rapid laboratory tests in cases of suspected BVD in the field. This means, preserving RNA for shorter periods of time, allowing the collection and shipping of samples to the laboratory at room temperature.

Whole-blood samples were collected from healthy bovines, and then spiked with a titrated Pestivirus B viral stock as previously described so that there were 50 000 copies of RNA in a 50 μ l drop, according to FI animal viral titers.

Five repetitions of 50 μ l of spiked blood drops were spotted on chromatography paper using micropipettes and sterile tips. Then, the drops were dried at RT for 4 h and finally stored at RT (15–25 °C), 4 °C, –20 °C and –70 °C for one and 7 days and 6, 12 and 18 months. The same methodology was performed on FTA cards: 5 drops of spiked blood were spotted for each temperature and stored for 12 and 18 months. The spiked filter papers were stored at different temperatures in zipped bags with desiccant to prevent humidity damage.

Once storage time expired, RNA was eluted. Briefly, four punches in each blood drop were cut with a 6 mm puncher and placed in 1.5 ml tubes containing 220 μ l of minimum essential medium (MEM). The tubes were then kept in a shaker for 30 min at RT and aliquots of 200 μ l were taken to proceed with RNA extraction and RT-qPCR described above including viral stock used as a positive control.

In order to prevent cross-contamination among samples and replicates, a protocol recommended in another study was followed. Briefly, the puncher was decontaminated between samples by dipping it in isopropyl alcohol for a minute. Later, the puncher was dried with absorbent paper and five punches were cut in a clean, new chromatography paper¹⁷.

Limit of detection in filter papers

To assess the LOD in blood spotted on filter papers, samples were spiked with viral stock at several concentrations and spotted on filter papers. For this purpose, two

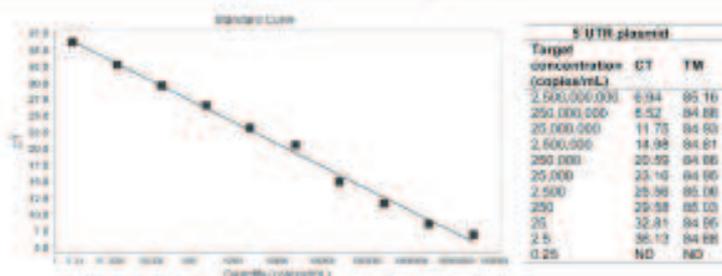


Figure 1 Left: Plasmid linear range of detection by the developed qPCR. Right: CT (cycle threshold) and Tm (melting temperature in °C) values for 10-fold dilutions of the 5'UTR plasmid. ND: not detected.

replicates of 50 µl drops of blood containing 100, 1000, 5000, 10 000, 20 000, 40 000 and 80 000 viral particles were spotted on chromatography paper and later processed as mentioned above.

Recovering RNA from clinical samples

Blood drops of two PI animals were spotted on chromatography paper, dried up at RT for 4h and then stored at 4 °C for 1 day and 6, 12 and 18 months. Once storage time expired, samples were processed as previously mentioned.

Statistical analysis

Aiming to compare the efficiency in recovering RNA between both types of papers at 12-month storage, a statistic analysis was conducted using the T-student and Fisher's tests. CT values and positive/negative results for each repetition stored at 4 °C and -20 °C were used for the T-Student and Fisher's tests, respectively.

Internal control to monitor nucleic acid extraction and PCR inhibitors

The efficiency of nucleic acid extraction and the presence of inhibitors for PCR amplification in semen and blood spotted on filter papers, fresh semen and tissue samples was checked by a qPCR assay using a set of primers that specifically amplify a fragment of the constitutive bovine GAPDH gene. For this purpose, GAPDH forward and reverse primer pairs²⁵ were used.

Results

RT-qPCR standardization

With regard to primer concentration adjustment, the best efficiency was observed in 470 nM (0.47 µM). The linear range of the PCR was from 2.5 × 10⁹ to 2.5 × 10¹ DNA copies/ml, with an efficiency of 97.3%, a slope of -3.389 and regression coefficient of 0.994. Based on the calculations made on the plasmid, the test detected 2.5 copies (LOD) (Fig. 1). Regarding the qPCR sensitivity for viral stocks, the qPCR amplified up to five copies of viral RNA. Among the sera and semen matrices, the test was able to detect up

to 50 RNA copies (Table 1a). Furthermore, the RT-qPCR test was able to detect a positive serum in a pool containing 30 bovine sera (Table 1b).

In regard to specificity, the qPCR did not amplify unrelated microorganisms (BRV, PI-3, BHV-1, BHV-5, BT, RVA and Mycoplasma spp.). Furthermore, the test was able to detect all bovine pestivirus strains evaluated. Melting temperature (Tm) values for each bovine pestivirus strain assayed is shown in Table 2, the specific range of Tm went from 84.69 to 85.78 °C. The precision analysis of the 5'UTR plasmid and viral stocks showed a relatively low standard deviation and poor dispersion of CT results with respect to the mean (Table 3). Concerning the inter-laboratory assays, it was possible to detect the plasmid in the three different laboratories using several cyclers, with CT values ranging from 13.92 to 22.

All clinical specimens collected from naturally infected animals which were positive to conventional gold standard methods (viral isolation followed by direct immunofluorescence) were positive when analyzed through the developed RT-qPCR, with CT values ranging from 15 to 35 (Supplementary material 1).

Finally, the GAPDH gene, which was used to monitor nucleic acid extraction and possible presence of PCR inhibitors in blood and semen spotted on filter papers, fresh semen and tissue samples, were positive in all runs, with Tm results ranging from 80 to 81 °C and homogeneous CT values (20 ± 3) for all specimens.

Pestiviral detection on filter papers

Filter papers spotted with spiked blood

As expected, when the storage period increased, the RNA recovering percentage among repetitions decreased. For instance, one and 7-day storage of blood drops on chromatography papers yielded a higher recovery percentage with respect to positive control CT when compared with 6 and 12-month storage. Regarding storage temperatures, in general, 4 °C, -20 °C and -70 °C were more effective in preserving RNA that RT, with a more marked trend as storage time increased (Table 4a).

When analyzing the samples stored for 12 months, results were similar in both types of papers (chromatography paper and FTA cards) at 4 °C and -20 °C storage temperatures

Table 1 (a) Number of copies detected by the qPCR in different matrices: virus stock (*Pestivirus Bvs253*), serum and semen straws. (b) CT (cycle threshold) mean for three replicates of the different pool sizes evaluated.

(a) Target concentration (copies/ml)	Virus stock	Serum	Semen straws
500 000	+	+	+
50 000	+	+	+
5 000	+	+	+
500	+	+	+
50	+	+	+
5	+	ND	ND

(b) Pool size (number of individual sera within the pool)	CT
10	30.3
20	30.7
30	32.2
40	ND
50	ND

ND: not detected.

Results are expressed as 95% agreement between 12 replicates.

Table 2 Melting temperature (TM) of bovine pestivirus strains assayed by the RT-qPCR.

Strain	TM (°C)
Bovine Pestivirus A ^a Singer	85.41
Bovine Pestivirus A ^a MF120553	85.50
Bovine Pestivirus A ^a 88625	85.78
Bovine Pestivirus A ^a 71267	85.2
Bovine Pestivirus A ^b 63588	85.08
Bovine Pestivirus A ^b 90611	85.59
Bovine Pestivirus A ^b MF120552	85.10
Bovine Pestivirus A ^b 59473	85.32
Bovine Pestivirus A ^b 83532	85.62
Bovine Pestivirus A ^b 73611	84.81
Bovine Pestivirus A ^b MF120594	85.22
Bovine Pestivirus A ^b 78296	85.42
Bovine Pestivirus A ^b 25366	85.32
Bovine Pestivirus B 76/08	85.36
Bovine Pestivirus B vs253	85.59
Bovine Pestivirus B MF120585	85.44
Bovine Pestivirus B MF120586	85.61
Bovine Pestivirus H D/210185K/13	84.69
Bovine Pestivirus H MK017821	84.80
Bovine Pestivirus H MH992643	85.58
Bovine Pestivirus H #48	85.1
Bovine Pestivirus H #51	84.92

^a Pestivirus A (formerly called BVD-1) sub-genotype a.

^b Pestivirus A (formerly called BVD-1) sub-genotype b.

(Table 4b). No significant differences were identified between both types of papers at 12-month storage at 4 °C ($p=0.865$) and at -20 °C ($p=0.776$) using the T-Student test, neither at 4 °C ($p=0.500$) nor at -20 °C ($p=0.500$) using the Fisher's test.

Unfortunately, it was not possible to process the samples stored at -70 °C. At 18 months, results were negative for all storage temperature variables in both types of papers.

Limit of detection in chromatography paper

With regard to the LOD in blood samples, the qPCR was able to detect up to 1000 copies of viral RNA (Table 5).

Recovering RNA in papers from clinical samples

Blood drops from two PI animals spotted on chromatography paper and stored for one day and 6 and 12 months at 4 °C yielded positive results by the developed RT-qPCR, suggesting that after one year of storage at 4 °C, there was no significant degradation of the viral RNA on the chromatography paper for both PI animals. CT values for the samples for one day storage were 28.39 and 32.9; for 6-month storage were 23.93 and 33.75; finally, for 12-month storage were 29.93 and 27.56, respectively. On the contrary, results were negative at 18-month storage time.

Discussion

The developed RT-qPCR was able to detect the viral RNA in all bovine pestivirus strains tested and showed high specificity. A major advantage is the ability to detect Pestivirus H strains, which can be useful in areas where Pestivirus H are co-circulating with Pestivirus A and B. Furthermore, complete agreement was observed between RT-qPCR and viral isolation results of all clinical samples tested. In pooled sera, the test was able to detect a positive animal among 30 sera, which is a significant advantage when carrying out BVD control in low-prevalence herds since it allows to reduce the number of assays. However, in herds where BVD prevalence is high, there is an increased chance that any single pool will test positive if the pool size is too large, requiring additional testing to identify the viremic individuals¹¹. Thus, prevalence estimation should be considered when laboratories use the pooling strategy, especially in regions with high BVD prevalence²⁰. Moreover, when the pool contains a large number of individual samples, the dilution effect can cause false negatives. This research has provided an in-house validated RT-qPCR that can replace commercially available kits, which represent a great trading cost for some countries.

Table 3 Mean, standard deviation, repetitions number (n), weighted average variation coefficient (CV_{wp}) and maximum random error allowed (CV_{rel}) of positive controls repetitions.

	Mean	Standard deviation	n	CV _{wp}	CV _{rel}
SUTR plasmid (2.5 × 10 ⁴ copies)	21.36	1.49	10	14.94	8.96
Pestivirus B vs253 (5.62 × 10 ⁶ copies)	13.78	1.94	25	10.63	6.38

Table 4 Replicates cycle threshold (CT) means, number of positive determinations and recovery percentage at different time-points and temperatures for spiked blood spotted on filter papers. (a) From chromatography paper. (b) From FTA cards.

	RT			4 °C			-20 °C			-70 °C		
	CT mean	PD	SD									
(a)												
1 day	27.14	5	2.09	25.58	4	0.57	25.64	5	1.98	27.23	4	1.78
Recovery %	84.16			89.29			89.08			83.88		
7 days	28.77	5	4.67	28.67	5	0.99	28.47	5	1.12	26.26	5	2.12
Recovery %	79.39			79.67			80.22			86.98		
6 months	32.1	3	1.18	25.12	3	1.73	24.83	5	0.84	22.02	3	0.99
Recovery %	48.35			61.78			62.31			57.67		
12 months	ND	0	-	27	4	0.6	26.87	4	0.96			NP
Recovery %	0			67.81			68.14					
(b)												
12 months	ND	0	-	27.11	3	0.55	28.52	3	8.78			NP
Recovery %	0			67.81			64.20					

ND: not detected; NP: not processed.

Table 5 Values for spiked blood spotted on chromatography paper at several target concentrations.

Target concentration (copies/ml)	Blood
80000	+
40000	+
20000	+
10000	+
5000	+
1000	+
100	ND

ND: not detected.

Results are expressed as 95% agreement between 12 replicates.

and can be useful for veterinary diagnostic laboratories equipped with the infrastructure to perform qPCR assays.

Because of the SYBR Green-based detection system, the developed RT-qPCR presents some advantages: it is sensitive, easy to use and inexpensive. However, it is important to recognize the presence of any double-stranded DNA (e.g., primer-dimers) that can cause false positive results. This inconvenient can be sorted including an analysis after the amplification run, using the melting temperature of the expected amplicon, which allows the discrimination of the target amplicon to undesired products that can interfere with the results¹¹. In addition, using One-Step for retro-transcription and PCR reaction simultaneously reduces the

costs, time consumed and possibilities of contamination of the assay.

Diagnostic laboratories routinely use blood or serum for BVD analyses. In terms of practicability in the use of filter papers at the point of care, whole blood is more suitable than serum since it avoids the centrifugation step. Although semen is not used as a sample of choice to diagnose bovine pestiviruses, it is useful for the control of BVD in breeding herds^{10,21}; however, our group tested the same methodology using semen straw samples spotted on filter papers without achieving satisfactory results (Supplementary material 2).

Concerning the collection and conservation of bovine pestiviral RNA on filter paper, the literature is scarce. One article describes the use of several filter papers to preserve RNA up to six months in blood and sera samples from PI animals at RT, 4 °C and -18 °C¹⁶. In this study, the authors evaluated four different types of papers: classical filter papers, Whatman paper No. 1, nitrocellulose membrane and HYBONDTM-M nylon membrane. Results were similar for all papers tested except for classical filter papers, which yielded lower PCR products. However, the authors used an end-point RT-PCR assay and RNA isolation was carried out directly from the filter papers, avoiding the elution step. Unfortunately, that strategy did not yield good results in our experiments (data not shown). Another study was reported in FTA cards for the detection of several viral agents involved in the bovine respiratory complex, including bovine pestivirus, where viral RNA from respiratory tract swabs was stored for 14 days at temperatures between -27 and 46 °C.

The article compared the RNA recovery from specimens in viral transport medium and FTA fixed samples, which proved 100% agreement¹¹. Unlike the former, in this paper, the authors used a qPCR assay and carried out an elution protocol before RNA extraction. Finally, a third article describes the use of FTA cards to spot nasal swabs and blood samples from PI animals that were immediately processed by real time-PCR without storage. In this paper, the authors compared the mentioned sampling method to fresh samples, and observed good agreement between both, except for an increase in CT values in FTA samples compared with fresh samples, which was not considered significant given the high viral load in PI samples⁸.

Our study suggests that chromatography papers are a useful alternative for collecting and shipping blood samples for BDV diagnostic purposes, as a cost-effective method. However, for longer storage time (6 and 12 months), the recovery percentages decreased, although RNA was still detected, meaning that the biobanking purposes are not suitable for more than 12-month storage at any temperature with the protocols evaluated in this experiment. Nevertheless, the fact that pestiviral RNA was amplified in PI animal blood stored up to 12 months in chromatography paper, suggests that, although the recovery percentage was lower as the storage time progressed, it was still possible to recover RNA in blood samples from PI animals kept at refrigeration temperature.

FTA cards contain chelating agents and a free-radical trap designed to deal with atmospheric pollutants, thus protecting the entrapped nucleic acids for at least six years at room temperature¹. However, in our work, chromatography paper (which lacks these components), yielded similar results. Moreover, for 12-month storage, drops spotted on chromatography paper showed slightly better results than on FTA cards, considering the number of positive repetitions.

When collecting samples, we recommend drying the drop spotted on filter papers at room temperature for at least 4h (depending on ambient humidity), and sending them to the laboratory in individual zipped bags with a desiccant, such as silica gel. For shipping, refrigeration is not necessary.

The possibility of storing viral nucleic acids on filter papers constitutes a breakthrough in veterinary practice. The chance to collect samples directly on filter papers from herds where the disease is suspected could be very helpful, since in this kind of matrix, samples do not require immediate shipping or refrigeration and more importantly, they do not need to be processed instantly⁸. This methodology is mostly advantageous when performing molecular studies, since it guarantees nucleic acid stability at a wide range of temperatures and filter papers can be used with a variety of samples. Compared with the traditional method for collecting, shipping and storing samples, filter paper methodology represents a major improvement especially in large countries with poor infrastructure for shipping samples and also for those lacking laboratories which run this type of assays in every state or province.

An advantage of using chromatography paper as a method for collecting samples is its cost. Every sheet of paper can hold approximately 25 drops of sample, with a value of USD 66.55 per 100 sheets. In contrast, only four drops of sample can be spotted on every FTA card, with an approximate cost of USD 308 (depending on the provider) per 25 sheets.

Our study demonstrated that an economical filter paper, such as chromatography paper, is an appropriate alternative for collecting, shipping and storing blood samples for BVD diagnosis, being the results yielded as good as those using FTA specialized cards. The aforementioned is valid, as long as it is accompanied by a highly sensitive technique such as the RT-qPCR reported in this study.

Further studies using this methodology applied to other viruses are warranted, especially for diseases relevant to bovine health, which require mandatory control and are economically important for local production in order to improve sampling, shipping and laboratory processing conditions.

Funding

Financial support for the execution of this study was provided by Fundación Argentina.

Conflict of Interest

The authors declared no conflict of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Acknowledgements

The technical assistance of Maximiliano Jordan, Emiliano Nicodemo and Darío Malacari is greatly appreciated.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ram.2022.10.002

References

1. Ahmed HA, MacLeod ET, Hyde G, Welburn SC, Picazzi K. The best practice for preparation of samples from FTA® cards for diagnosis of blood borne infections using African trypanosomes as a model system. *Parasit Vectors*. 2011;4:1-7.
2. Bhowal JK, Subramaniam S, Ranjan R, Pattnaik B. Evaluation of FTA® card for the rescue of infectious foot-and-mouth disease virus by chemical transfection of extracted RNA in cultured cells. *Mol Cell Probes*. 2016;30:225-30.
3. Brock KW, Grooms DL, Bidpathi J, Bolin SR. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest*. 1998;10:22-5.
4. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55:1-12.
5. Cardona-Ospina JA, Villaiba-Miranda ME, Palechor-Ocampo LA, Mancilla LJ, Sepúlveda-Arias JC. A systematic review of FTA cards® as a tool for viral RNA preservation in fieldwork: are they safe and effective? *Prev Vet Med*. 2019;172:1-11.
6. Choi EH, Lee SK, Kim C, Sohn YH. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking. *Osong Public Heal Res Perspect*. 2014;5:351-7.
7. Dubovi EJ. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*. 2013;41:8-12.

8. Foster C, Hoar B, Acopin D, Hosman BE. Evaluation of FTA cards as a sample collection method for detection of BVDV in persistently infected beef cattle. *Bov Pract.* 2014;46:38–44.
9. Hall-Wendelin S, Hewitson GR, Gange D, Burtonclay FJ, De Jong AJ, Pyke AJ, Van Den Hurk AE. FTA cards facilitate storage, shipment, and detection of arboviruses in infected aedes aegypti collected in adult mosquito traps. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96:1241–3.
10. Józwiak M, Wyrostek K, Domarska-Blicharz K, Olszewska-Tomiczyk M, Śmietanka K, Minta Z. Application of FTA® Cards for detection and storage of avian influenza virus. *J Vet Res.* 2016;60:1–6.
11. Rhodakaram-Tafti A, Farjankish GH. Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iran J Vet Res.* 2017;18:154–53.
12. Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP, Brownlie J. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Vet J.* 2014;201–9.
13. Liang X, Chigwe M, Hietala SK, Crossley BM. Evaluation of Fast Technology Analysis (FTA) Cards as an improved method for specimen collection and shipment targeting viruses associated with Bovine Respiratory Disease Complex. *J Virol Methods.* 2014;202:69–72.
14. Urthaler DCI, Rovira A, Tommerell M. Evaluation of Flinders Technology Associates cards for collection and transport of samples for detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 2012;24:328–32.
15. MacLachlan NJ, Dubovi E. *Flaviviridae*. In: MacLachlan NJ, Dubovi E, editors. *Fenner's veterinary virology*. Academic Press; 2017. p. 525–45.
16. Mayling A, Mikol Jensen A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet Microbiol.* 1988;17:97–105.
17. Moennig V, Bocher P. Control of bovine viral diarrhoea. *Pathogens.* 2018;7:1–12.
18. Mantello FL, Canginiutti JF, Martins B, Noll JG, Weiblen R, Flores EF. Detection of bovine pestiviruses in sera of beef calves by a RT-PCR based on a newly designed set of pan-bovine pestivirus primers. *J Vet Diagn Invest.* 2019;31:255–8.
19. Muñoz-Zanzi CA, Johnson WD, Thurmond MC, Hietala SK. Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2000;12:195–203.
20. Newcomer BW. 75 years of bovine viral diarrhoea virus: current status and future applications of the use of directed antivirals. *Antiviral Res.* 2021;196:105205.
21. Nugroho W, Junianti R, Silitonga P, Reichel MP, Iramingih H, Wicaksono MS. The epidemiology and control of bovine viral diarrhoea virus in tropical Indonesian cattle. *Pathogens.* 2022;11:1–19.
22. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:2002–7.
23. Ririe NM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997;245:154–60.
24. Robinson TL, Sutherland IA, Sutherland J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;115:160–5.
25. Sakai T, Ishii A, Segawa T, Takagi Y, Kobayashi Y, Ito T. Establishing conditions for the storage and elution of rabies virus RNA using FTA® cards. *J Vet Med Sci.* 2015;77:461–5.
26. Sambrook J, Russell DW. Preparation and transformation of competent E. coli using calcium chloride. *Cold Spring Harb Protoc.* 2006;1:116–8.
27. Sarangi LR, Navrota T, Rana SK, Surendra KSNL, Reddy RVC, Rajbabu P, Ponanna NM, Sharma GK, Srinivasan VK. Evaluation of a specialised filter-paper matrix for transportation of extended bovine semen to screen for bovine herpesvirus-1 by real-time PCR. *J Virol Methods.* 2018;257:1–5.
28. Schirmeler H, Strobelow G, Dapner K, Hoffmann B, Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J Gen Virol.* 2004;85:3647–52.
29. Smith DB, Meyers G, Buhr J, Gould EA, Monath T, Muerhoff AS, Plotnev A, Rico-Hesse R, Stapleton JT, Simmonds P, Bochar P. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *J Gen Virol.* 2017;98:2106–12.
30. Smith RL, Sanderson MW, Walz PH, Givens MD. Sensitivity of polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled serum samples and use of pooled polymerase chain reaction to determine prevalence of bovine viral diarrhoea virus in auction market cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2008;20:75–8.
31. Spötter MJ, Lougo Urtao EL, Armandano JI, Álvarez L, Nonero MS, Storani L, Penya SB, Yerna AE, Odoón AC, González Altamiranda EA. Frequency of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in Argentinian bovine herds and comparison of diagnostic tests for BVDV detection in bovine serum samples: a preliminary study. *Brazilian J Microbiol.* 2021;52:467–75.
32. Spötter MJ, Lougo Urtao EL, Armandano JI, Morrill EL, Cantón GJ, Yerna AE, Dorsch MA, Penya SB, Odoón AC, Salido JT, González Altamiranda EA. Detection methods and characterization of bovine viral diarrhoea virus in aborted fetuses and neonatal calves over a 22-year period. *Braz J Microbiol.* 2020;51:2077–86.
33. Tam RJ, Esora MD, Williams A, Ndiru VN, Bosla A, Bowen MD. Evaluation of BBL™ Semi-Discs™ and FTA® cards as sampling devices for detection of rotavirus in stool samples. *J Virol Methods.* 2015;222:41–6.
34. Vliček S, Strujić L, Đurković B, Rosmanith W, Paton D. Storage of bovine viral diarrhoea virus samples on filter paper and detection of viral RNA by a RT-PCR method. *J Virol Methods.* 2001;92:19–22.
35. Wüber MW, Wörsen ACS, Simoes SVD, Almeida LL, Pessoa CRM, Budziejewski RF, Silva TR, Rüdolph JF, Riet-Correa F, Delamele D, Canal CW. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with 'HoBi'-like pestivirus in a field outbreak. *Transbound Emerg Dis.* 2016;63:92–100.
36. Wernke K, Gethmann J, Schirmeler H, Schneider R, Conraths FJ, Beer M. Six Years (2011–2016) of mandatory nationwide bovine viral diarrhoea control in Germany – a success story. *Pathogens.* 2017;6:1–8.



HoBi-like pestivirus in 2 cases of fatal respiratory disease of feedlot cattle in Argentina

Carlos A. Margineda,¹ Franco Matias Ferreyra,¹ Franco Masnyj,¹ Maximiliano Audrito,¹ Paula Melisa Favaro,¹ Dus Santos Maria José,¹ Andrea Pecora¹

Abstract. HoBi-like pestivirus (HoBiPeV) is an emerging virus that has been detected in cattle and other ruminants. We diagnosed 2 cases of fatal bovine respiratory disease complex (BRDC) associated with infection with HoBiPeV in a feedlot in Argentina. The main findings in 2 steers autopsied were interstitial bronchopneumonia (case 1) and fibrinous bronchopneumonia (case 2). HoBiPeV was detected by RT-PCR in lungs of both animals and by immunohistochemistry in case 2. Phylogenetic analysis showed that both strains clustered within the “Brazilian-Italian” clade. In case 2, *Mannheimia haemolytica* was isolated from the lung. There is scant information about the contribution of HoBiPeV to the pathogenesis of BRDC. To our knowledge, HoBiPeV has not been reported previously in association with *M. haemolytica* pneumonia. Our findings further support the involvement of HoBiPeV in cases of BRDC and contribute to understanding the synergy of this etiologic agent in the pathogenesis of BRDC, which is critical for the development of appropriate preventive strategies.

Keywords: bovine; pestiviruses; bovine viral diarrhoea virus; respiratory disease.

Pestiviruses (*Flaviviridae*) have been assigned to 11 different species (*Pestivirus A–K*) based on phylogenetic analysis.¹ *Pestivirus A* and *B* (formerly bovine viral diarrhoea virus, BVDV1 and BVDV2) are well characterized as important pathogens in cattle, and are distributed in cattle populations worldwide.² An emerging pestivirus denoted as *Pestivirus H* (also known as HoBi-like pestivirus, HoBiPeV) has been described.^{3,29} HoBiPeV was first isolated from a contaminated batch of fetal bovine serum from Brazil in 2004¹; HoBiPeV isolates have since been reported in South America,^{30,31} Europe,^{7,8} and Asia.^{3,28}

Infections by pestiviruses in ruminants cause important economic losses to the livestock industry worldwide,³² and understanding the genetic diversity of pestiviruses within a country is essential for the implementation of regional control programs.²¹ HoBiPeV infections in cattle may cause a variety of clinical presentations including diarrhoea, mucosal disease-like lesions, respiratory signs, and reproductive failure.^{3,3,37,38,39} In experimental infections, HoBiPeV induced leukopenia,^{3,37} and may cause signs of respiratory disease^{7,8}; therefore, involvement of HoBiPeV in the bovine respiratory disease complex (BRDC) has been proposed.³⁴ Here we describe 2 fatal cases of BRDC associated with HoBiPeV-infected cattle in a feedlot in Argentina.

In 2017, the owner of a cattle feedlot reported outbreaks of BRDC in 2 pens (1 and 2). The outbreaks occurred on different dates in May, and the pens were 1,025 m apart. The

feedlot was located in the province of Cordoba, Argentina, and capacity at the time of the outbreak was 21,895 steers of different ages (5–14-mo-old). No information was available regarding the BVDV persistent infection status of animals entering the system. The feedlot management data indicated low-to-moderate annual mortality (1.14%). The population was composed of weaned beef and dairy calves from northern and central provinces of Argentina, which entered the feedlot when 5–7-mo-old. Feedlot management included prophylactic measures, such as vaccination and metaphylaxis with tilmicosin, to control the BRDC. The calves

Sanidad Animal, Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Marcos Juárez, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Córdoba, Argentina (Margineda, Masnyj); Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina (Margineda); Kansas State University Veterinary Diagnostic Laboratory, Kansas State University, Manhattan, KS, USA (Matias Ferreyra); Establecimiento Don Sebastián, Córdoba, Argentina (Audrito); FCV, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina (Favaro); Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, INTA, Castelar, Buenos Aires, Argentina (Pecora, Dus Santos); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina (Pecora, Dus Santos).

¹Corresponding author: Andrea Pecora, Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, INTA, Nicolás Repetto y de Los Ríos 838 - Barilichean, Buenos Aires, Argentina. andypecora@hotmail.com

Table 1. Antibodies, dilutions, method of antigen retrieval, and sources of the immunohistochemical assays.

Primary antibody	Target antigen	Dilution and incubation	Source	Antigen retrieval	Detection system	Chromogens
Anti-BVDV immunoglobulin G1 mouse monoclonal	GP48 protein	1:100, ambient temperature, 15 min	Catalog no. 332F1, lot F180820-008; VMRD	BOND enzyme pretreatment kit enzyme, 0.1%; Leica 37°C, 10 min	BOND polymer refine red detection; Leica Polymeric alkaline phosphatase	Fox red chromogen; Leica
Anti- <i>Mycoplasma bovis</i> mouse monoclonal	Strain M23, clone MY3163	1:100, 4°C, 18 h	MAB970; MilliporeSigma	Heat for 10 min at 100°C in citrate buffer	Avidin-biotin complex; Cell Marque	3,3'-diaminobenzidine chromogen; Cell Marque

were vaccinated within 48–72 h after arrival with a commercial multivalent inactivated vaccine (Provident Respiratoria; Tecnovax) containing BVDV1, bovine herpesvirus 1 (BoHV1; *Bovine alphaherpesvirus 1*), *Bovine respiratory 3* (bovine parainfluenza virus 3, BPIV3), *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, and *Pasteurella multocida*. Animals were revaccinated at 21 d after arrival. In pen 1, BRDC morbidity was 6 of 107 (5.6%) and mortality was 4 of 107 (3.7%) steers. The affected animals of this pen were 7-mo-old mixed steers that had been in the feedlot for 29 d when the first case occurred. In pen 2, morbidity was 4 of 69 (5.8%) and mortality was 3 of 69 (4.3%) steers. The affected animals in this pen were 5-mo-old Aberdeen Angus steers that had been in the feedlot for 38 d when the first case occurred. Affected steers had a cough, excessive nasal discharge, dyspnea, and fever (≥40°C).

Veterinary practitioners performed autopsies (cases 1 and 2, from pens 1 and 2, respectively) immediately after arrival at the premises. In case 1, marked cranioventral consolidation involved 40–50% of the pulmonary parenchyma; affected sections of lung were firm and dark-red. In case 2, severe cranioventral consolidation involved 60% of the pulmonary parenchyma. The pleura was multifocally covered with fibrinous exudate, and there were locally extensive areas of purple-red consolidation and hemorrhage on cut surfaces. An initial gross diagnosis of fibrinous bronchopneumonia was established for both cases. No other significant gross abnormalities were observed in either carcass; in particular, the esophagus, oral cavity, and intestines appeared grossly normal. Lung samples were obtained at autopsy for ancillary bacteriologic, virologic, and histologic testing.

Lung samples were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 72 h, processed routinely, and stained with H&E. Immunohistochemistry (IHC) was performed for BVDV (BVDV1 and BVDV2) and *Mycoplasma bovis* antigens. Tissue sections were mounted on slides, deparaffinized, rehydrated, and then subjected to antigen retrieval and incubated with primary antibodies and detection systems (Table 1). The sections were then counterstained with hematoxylin. Tissues of cattle naturally infected with BVDV (ear notch) or *M. bovis* (lung) were used as positive controls.

Portions of the lungs were homogenized in mortars using sterile sand and Earle minimum essential medium supplemented with antibiotics. The tissue suspensions were centrifuged, and the supernatant was stored at –70°C. Viral nucleic acids were extracted from aliquots of samples (High Pure viral nucleic acid kit; Roche). PCR assays were used to detect bovine respiratory syncytial virus (BRSV; *Bovine orthopneumovirus*),²⁰ BPIV3,²¹ BoHV1, and BoHV5 (*Bovine alphaherpesvirus 5*).⁴ Reverse-transcription PCR (RT-PCR) assays for pestiviruses were performed with 189-389 and N2-R5 primers reported previously, which amplify the partial 5'-untranslated region of the genomes of pestiviruses BVDV1, BVDV2, and HoBiPeV (189-389 primers)²¹ or HoBiPeV (N2-R5 primers).² Reverse transcription was performed with M-MLV (Moloney murine leukemia virus) enzyme (Promega) and random hexamers (Biodynamics). The PCR was performed with GoTaq enzyme (Promega). The products (200 bp for 189-389 primers, and 150 bp for N2-R5 primers) were purified from agarose gels (Illustra GFX PCR DNA, Cytiva; Gel band purification kit, GE). Amplicons were not cloned but sequenced directly in both directions, and all samples were tested in duplicate. Sequencing was performed by the Genomic Unit of INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina. The phylogenetic analysis for pestiviruses was performed as described previously.²² Briefly, multiple sequence alignment was performed with ClustalW3 v.2.1 (<https://www.ebi.ac.uk>). The dendrograms were obtained under Kimura distances method and neighbor-joining using MEGA 4 (<https://www.megasoftware.net/mega4/mega.html>); the bootstrap value was calculated using 1,000 replicates of the alignment. Trees were drawn with Dendroscope 2.7.4.²³ Nucleotide sequences of the strains obtained were submitted to GenBank (MZ189735, MZ189734).

The bacteriologic analysis was performed by inoculating lung tissue on blood agar and MacConkey agar plates. One set of the culture plates was incubated aerobically, and the duplicate under microaerophilic conditions (5% CO₂). Plates were incubated at 37°C for 48 h. Identification of isolates cultured was based on Gram stain, colony morphology, biochemical analyses, and using MALDI-TOF mass spectrometry.

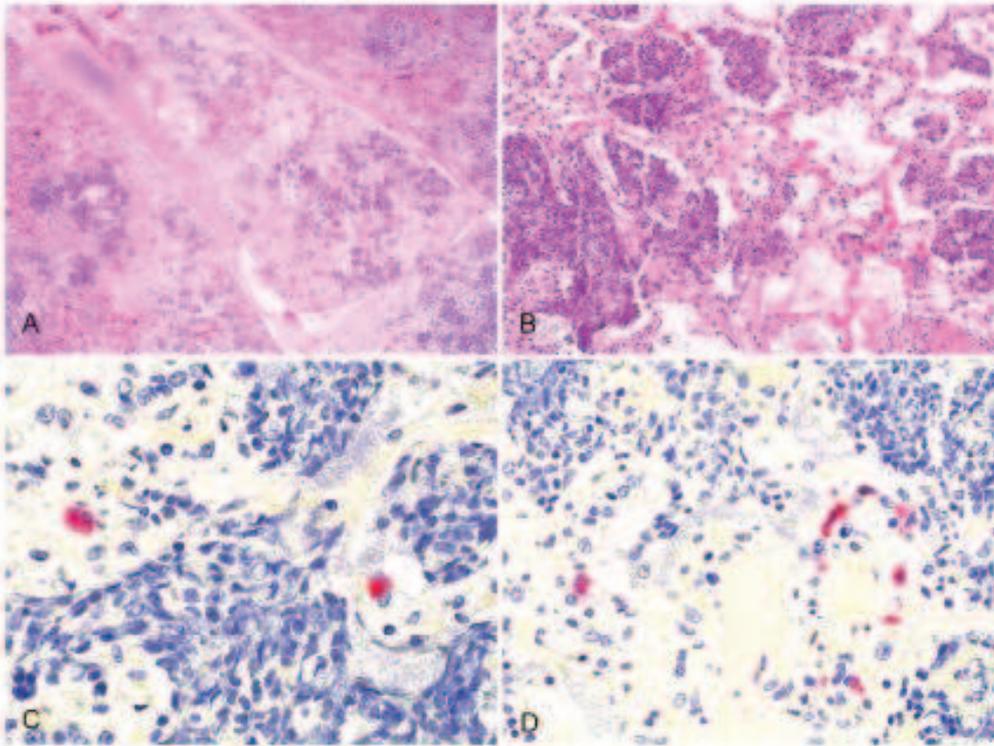


Figure 1. Histologic lesions in a case of bovine respiratory disease with coinfection of HoBi-like pestivirus and *Mannheimia haemolytica*, case 2. **A.** Fibrinous pneumonia with multifocal areas of necrosis, congestion, hemorrhage, and edema. H&E. **B.** Infiltrates of large numbers of fat cells and fibrin in alveoli. H&E. **C.** Immunohistochemical detection of pestivirus antigens in lung tissue; red staining shows positive immunoreactivity in type II pneumocytes. Pestivirus IHC. Hematoxylin counterstain. **D.** Positive immunoreactivity in the endothelium of a capillary, and venule of the lung. Pestivirus IHC. Hematoxylin counterstain.

(MS; Microflex LT, Bruker). For MALDI-TOF MS, protein extraction was performed according to the manufacturer's instructions.

The histologic lesions in the lungs differed in the 2 cases. In case 1, there was moderate-to-severe bronchiointerstitial pneumonia characterized by necrotic bronchiolar epithelium and hyperplasia of type II pneumocytes. There were occasional prominent alveolar macrophages in the lumen, and type II pneumocyte hyperplasia, congestion, and expansion of the alveolar walls by a mild infiltrate of mononuclear inflammatory cells. In case 2, there were prominent areas of fibrinosuppurative bronchopneumonia (Fig. 1A), characterized by multifocal areas of necrotizing alveolitis with accumulation of degenerate neutrophils with streaming nuclei (out cells; Fig. 1B), fewer macrophages, and fibrin within alveolar spaces and bronchiolar lumina. Hemorrhages,

thromboses, and edema of the interlobular septa and fibrinous pleuritis were evident in both cases. BVDV IHC was positive in the lung of case 2 in which finely stippled intracellular red staining was present in individual (Fig. 1C) and random clusters of macrophages (Fig. 1D) and type II pneumocytes. In case 1, no immunostaining was observed for BVDV. IHC for *M. bovis* was negative in both cases.

BRSV, BPIV3, BoHV1, or BoHV5 was not detected in lung samples of either animal. However, PCR assays for pestivirus detection amplified HoBiPeV genetic material in both cases. Phylogenetic analysis showed that both strains clustered in the "Brazilian-Italian" clade (Suppl. Fig. 1). The homology between the strains was 98.5% (Fig. 2). No significant bacterial growth was evident in aerobic and microaerophilic cultures in case 1. Bacterial cultures from case 2 yielded pure growth of *M. haemolytica*-like bacteria. Based

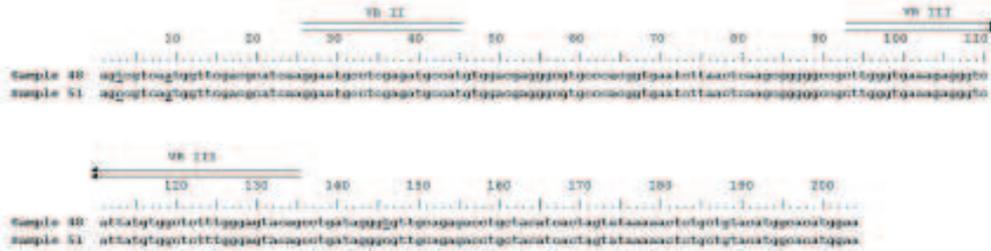


Figure 2. Alignment of nucleotide sequences from the 5'-UTR of HoBi-like strains 48 (MZ189735) and 51 (MZ189734). The nucleotide differences between the samples (positions 3, 9, 146) are underlined. Two variable regions are double outlined (VR II and VR III).

on biochemical tests and MALDI-TOF MS findings, isolates were identified as *M. haemolytica*.

The results of the PCR assay and nucleotide sequencing confirmed the infection by HoBiPeV of the 2 feedlot steers affected with acute BRDC. BRDC is one of the main causes of morbidity and mortality in feedlots, and BVDV1 and BVDV2 are frequently involved in outbreaks of BRDC,^{11,12} with differences in virulence and pneumopathogenicity described among BVDV genotypes and strains.²⁶ HoBiPeV and other viruses (BoHV1, BRSV, and BPIV3) have been detected in nasal swabs in an outbreak of BRDC, suggesting that HoBiPeV infection is associated with cases of BRDC, and HoBiPeV should be considered as part of BRDC.³⁴ Several reports have identified HoBiPeV associated with signs of respiratory disease³⁴; however, most of these reports described the detection of HoBiPeV alone, and not in association with another BRDC agent.^{16,20,30} In these reports, there was no evidence of coinfection with other bacterial BRDC agents such as *M. haemolytica*, *P. multocida*, *M. bovis*, or *H. somni*. In one study, coinfection of HoBiPeV and *Streptococcus bovis* was identified.⁷ To our knowledge, coinfection by HoBiPeV and *M. haemolytica*, one of the main agents of BRDC,^{12,13,30} has not been reported previously.

The clinical signs observed in our cases were similar to other cases of respiratory disease.^{17,34} The fact that 2 animals were tested and that both were positive represents strong evidence of the involvement of HoBiPeV in the development of these BRDC cases. In various reports of HoBi-like postviral infection,^{37,9} lesions frequently observed included tracheitis, catarrhal bronchopneumonia, or interstitial pneumonia; the lesions in the 2 steers autopsied and reported here were interstitial bronchopneumonia (case 1) and fibrinous bronchopneumonia (case 2). The lesions found in both cases described here are consistent with severe pulmonary infections by *M. haemolytica*.¹²

In IHC slides in case 2, we observed that the monoclonal antibody developed to detect BVDV1 and BVDV2⁵ had cross-reactivity with HoBiPeV. This cross-reactivity was expected, given that the GP48 protein is highly conserved in various BVDVs. In our case, immunolabelling of antigenic

HoBiPeV was observed more frequently in areas of the lung with moderate-to-severe inflammatory lesions compared to areas with milder lesions. Hence, we believe that HoBiPeV contributed to the development of the lesions. In previous studies,^{2,16} BVDV antigen was detected by IHC in spleen, mesenteric lymph nodes, thymus, digestive tract, liver, lung, kidney, and CNS of persistently, as well as of acutely, infected animals. We found no reports of the distribution of HoBiPeV detected by IHC in tissues of infected calves. In case 2, we observed that HoBiPeV infected pneumocytes, small vessel endothelial cells, and intra-alveolar macrophages, which is consistent with studies that evaluated animals infected with BVDV1¹⁸ and BVDV2.²

The detection of HoBiPeV in alveolar macrophages and pneumocytes in case 2 suggests that this virus could have favored bacterial colonization by *M. haemolytica*, and may also suggest that this virus play an important role, likely altering the innate defense mechanisms of the lung, as other authors have reported in experimental BVDV infections.²⁶ Various reports have shown synergism between bovine pestivirus and other BRDC pathogens; infections by BVDV1b are commonly associated with severe secondary infections by *M. haemolytica* or *M. bovis*.¹² The absence of specific IHC staining in the lung section in case 1 could indicate lack of sensitivity of the IHC technique to detect this strain, or low viral loads of HoBiPeV in tissue. Unfortunately, we were unable to obtain lymphoid tissue or ear notch samples to determine if the animals were persistently infected with BVDV.

HoBiPeV has been detected in fetal bovine serum in Argentina, although no clinical cases have been described in Argentina before our cases, to our knowledge.⁷ The HoBiPeV strains of our outbreak were genetically similar to Brazilian strains.^{10,42} The 2 sequences that we identified were very similar, which would suggest that the same strain was responsible for the outbreaks in the 2 pens. The sequences analyzed in our work were very short; it would be interesting in the future to sequence a more representative region of the genome in order to make a more complete analysis. These outbreaks, involving animals from different origins within a commercial feedlot, in addition to previous detection of the

virus in fetal bovine serum from different regions of the country²⁴ and seropositivity in water buffaloes,²⁵ suggests that HoBiPeV is distributed widely in Argentina.

In Argentina, several BRDC vaccines include BVDV1, and those available are frequently formulated with inactivated viruses, without further specification of the included viral strains. Vaccination is an efficient method to reduce viral disease; however, the genetic heterogeneity observed in bovine pestiviruses may challenge and compromise the effectiveness of control and eradication programs.¹ Studies involving pestiviral cross-antigenicity have shown limited cross-immunity between different strains, indicating the need to include new genotypes and strains in vaccine formulations.^{19,20,23} The current practice of sourcing steers from diverse origins for finishing in the central region of Argentina, and the use of current BVDV vaccines, may provide a favorable scenario for the spread of HoBiPeV.

Acknowledgments

We thank Dr. Shofie M. Falkenberg for reading this manuscript critically.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

Our work was funded by project INTA-PNSA-1115054, INTA-AUDEAS-CONADEV-940148, ArgentINTA Foundation, and INTA RIST 1111 and 1103.

ORCID iDs

Carlos A. Margineda  <https://orcid.org/0000-0002-2218-6702>

Franco Marcos Ferreira  <https://orcid.org/0000-0002-2661-7530>

Paula Melissa Favaro  <https://orcid.org/0000-0001-5518-311X>

Supplemental material

Supplemental material for this article is available online.

References

- Bauermann FV, et al. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J Vet Diagn Invest* 2013;25:6–15.
- Bauermann FV, et al. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. *J Vet Diagn Invest* 2014;26:16–17.
- Chen M, et al. HoBi-like pestivirus infection leads to bovine death and severe respiratory disease in China. *Transbound Emerg Dis* 2021;68:1069–1074.
- Clauß MP, et al. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J Virol Methods* 2005;128:183–188.
- Confer AW, et al. Viral antigen distribution in the respiratory tract of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus subtype 2a. *Vet Pathol* 2005;42:192–199.
- Cruz HAS, et al. Mucosal disease-like lesions caused by HoBi-like pestivirus in Brazilian calves in 2016–2017: clinical, pathological, immunohistochemical, and virological characterization. *Res Vet Sci* 2018;119:116–121.
- Decaro N, et al. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1549–1552.
- Decaro N, et al. Experimental infection of cattle, sheep and pigs with 'HoBi'-like pestivirus. *Vet Microbiol* 2012;155:165–171.
- Decaro N, et al. HoBi-like pestivirus: both biotypes isolated from a diseased animal. *J Gen Virol* 2012;93:1976–1983.
- Dias RK, et al. Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. *Vet Microbiol* 2017;203:221–228.
- Fulton RW, et al. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 1c in persistently infected cattle entering a feedlot. *J Am Vet Med Assoc* 2006;228:578–584.
- Fulton RW, et al. Lung pathology and infectious agents in fawn feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatment. *J Vet Diagn Invest* 2009;21:464–477.
- Gagea MI, et al. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *J Vet Diagn Invest* 2006;18:18–28.
- Hoppe III, et al. HoBi-like pestivirus infection in an outbreak of bovine respiratory disease. *Res Vet Sci* 2019;126:184–191.
- Huson DH, et al. Dendroscope: an interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Informatics* 2007;8:460.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. *Genus: Pestivirus*, 2021. [cited 2021 Oct 18]. <https://talk.ictvonline.org/previous-reports/previous-reports/pestivirus-sensu-largoviruses/w/fluvi/indae/361/genus-pestivirus>
- Jardim JC, et al. Respiratory signs, fever and lymphopenia in calves inoculated with Brazilian HoBi-like pestiviruses. *Microb Pathog* 2018;123:264–268.
- Machuga SS, et al. Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC Vet Res* 2012;8:83.
- Manhalli DM, et al. Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Pathol* 1996;33:311–318.
- Mishra N, et al. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet Microbiol* 2014;174:239–246.
- Monteiro FL, et al. Detection of bovine pestiviruses in sera of beef calves by a RT-PCR based on a newly designed set of pan-bovine pestivirus primers. *J Vet Diagn Invest* 2019;31:255–258.
- Mosera ACS, et al. Genomic and antigenic relationships between two 'HoBi'-like strains and other members of the Pestivirus genus. *Arch Virol* 2017;162:3025–3034.
- Pocora A, et al. First finding of genetic and antigenic diversity in 16-BVDV isolates from Argentina. *Res Vet Sci* 2014;96:204–212.
- Pocora A, et al. Molecular characterization of pestiviruses in fetal bovine sera originating from Argentina: evidence of circulation of HoBi-like viruses. *Front Vet Sci* 2019;6:359.
- Pocora A, et al. Serologic evidence of HoBi-like virus circulation in Argentinian water buffalo. *J Vet Diagn Invest* 2017;29:926–929.

26. Ridpath J. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. *Vis Clin North Am Food Anim Pract* 2010;26:335-348.
27. Silveira S, et al. HoB1-like is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65:e113-e120.
28. Sukh K, et al. Natural infection of cattle with an atypical 'HoB1'-like pestivirus—implications for BVD control and for the safety of biological products. *Ver Res* 2007;38: 517-523.
29. Vilcek S. Vytvoj PCR testů na detekci BHV-1, BRSV a pestivirusů (Development of PCR tests for the detection of bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial viruses and pestiviruses). *Ver Med (Prah)* 1994;39:687-700. Slovak.
30. Weber MN, et al. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with 'HoB1'-like pestivirus in a field outbreak. *Transbound Emerg Dis* 2016;63:92-100.
31. Zhang M, et al. The pulmonary virome, bacteriological and histopathological findings in bovine respiratory disease from western Canada. *Transbound Emerg Dis* 2020;67:924-934.