

Conclusión

Se demostró correlación de variables de movilización de reservas y metabólicas en función de balance energético. El D-HB no se correlacionó con balance energético.

Bibliografía

- AGNEW, R.E y Col. Relationships between urea dilution measurements and body weight and composition of lactating dairy cows. **Journal Dairy Science** 2005.
- EDMONSON y Col. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal Dairy Science** 1989.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL- NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. Rev. ed. Washinton, D.C. 2001.
- SCHRDER y STAUFENBIEL Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic measurement of backfat thickness. **Journal Animal Science** 2006.
- VAN DER DRIFT y Col. Protein and fat mobilization and associations with serum - hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. **Journal Animal Science** 2012.
- WEBER y Col. Hepatic gene expression involved in glucose and lipid metabolism in transition cows: Effect on fat mobilization during early lactation in relation to milk performance and metabolic changes. **Journal Dairy Science** 2013.

Caracterización genética del virus de la diarrea viral bovina en Uruguay

Leticia Maya¹; Rodrigo Puentes²; Franklin Riet-Correa³; Federico Giannitti³; Rodolfo Rivero⁴; Edgardo Giannechini⁴; Eduardo Furtado Flores⁵; Rodney Colina¹.

¹Laboratorio de Virología Molecular Salto, CENUR Litoral Norte, Udelar, Uruguay; ²Laboratorio de Virología, Facultad de Veterinaria, Udelar, Uruguay; ³Plataforma de Investigación en Salud Animal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay; ⁴DILAVE "Miguel C. Rubino", Laboratorio Regional Noroeste, Paysandú, Uruguay; ⁵Sector Virología, Universidad Federal de Santa Maria- Santa Maria, RS. Brasil.

Resumen

El virus de la Diarrea viral Bovina (BVDV) es un virus económicamente importante siendo una de las causas de desórdenes reproductivos y productivos en bovinos mundialmente. Se han reconocido 2 genotipos virales: BVDV-1 y BVDV-2, y más recientemente se ha propuesto un nuevo genotipo de BVDV conocido como *Pestivir* HoBi-like. En Uruguay BVDV es un problema importante. Un estudio serológico con muestras del 2000-2001, reveló que todos los predios son seropositivos con una seroprevalencia promedio de 67%. En el año 2016 publicamos la primera caracterización genética de BVDV en Uru-

guay con muestras colectadas en 2014. BVDV-1 y BVDV-2 circulan en nuestros rodeos, y parecía haber una supremacía de BVDV-1a. Hemos continuado con la detección y caracterización de BVDV durante el periodo 2015-2017, confirmando la predominancia de BVDV-1a en nuestro muestreo. Nuestras cepas BVDV-1a parecen estar diversificándose en nuestro territorio en un nuevo linaje que dista de las cepas de este subtipo viral usadas en la formulación de vacunas por lo que es interesante continuar el estudio de estas cepas uruguayas con el fin de elaborar planes de control de la enfermedad acordes para nuestros rodeos.

Summary

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is an economically important virus being one of the causes of reproductive and productive disorders in cattle worldwide. Two viral genotypes have been recognized: BVDV-1 and BVDV-2, and more recently a new genotype of BVDV known as *Pestivirus* HoBi-like has been proposed. In Uruguay BVDV is a major problem. A serological study with samples from 2000-2001, revealed that all farms are seropositive with an average seroprevalence of 67%. In 2016 we published the first genetic characterization of BVDV in Uruguay with samples collected in 2014. BVDV-1 and BVDV-2 circulated in our herds, and there seemed to be a supremacy of BVDV-1a. We have continued with the detection and characterization of BVDV during the period 2015-2017, confirming the predominance of BVDV-1a. Our strains BVDV-1a seem to be diversifying in our territory in a new lineage that is far from the strains of this viral subtype used in the formulation of vaccines so it is interesting to continue the study of these Uruguayan strains in order to develop control plans of the disease according to our rodeos.

Introducción

El virus de la Diarrea viral Bovina (BVDV) es un virus económicamente importante siendo una de las causas más importantes de desórdenes reproductivos y productivos en bovinos a nivel mundial. Este virus se transmite de manera horizontal causando múltiples afecciones clínicas dentro de las que se destacan problemas reproductivos, desórdenes gastrointestinales, distrés respiratorio, e inmunodepresión. BVDV además se transmite horizontalmente generando animales persistentemente infectados (PI), excretores sanos que infectan al resto del rodeo. Se han reconocido 2 genotipos virales: BVDV-1 que se subdivide en 20 subtipos virales BVDV-1a-t; y BVDV-2 que se subdivide en 3 subtipos, BVDV-2a-c. Recientemente se propuso un nuevo genotipo de BVDV denominado *Pestivirus* tipo HoBi. En la región se han detectado los 3 genotipos de BVDV. En Brasil se han descrito los subtipos BVDV-1a,

1b, 1i, 1d, BVDV-2b y *Pestivirus* tipo HoBi (Flores y col., 2002; Vilcek y col., 2004; Cortez y col., 2006; Weber y col., 2014; Silveira y col. 2015; Mósená y col. 2016). En Argentina se ha reportado la circulación de los subtipos BVDV-1a, BVDV-1b y BVDV-1c, y de BVDV-2a y BVDV-2b (Jones y col., 2001; Pecora y col., 2014). En Uruguay BVDV es un problema importante a nivel reproductivo y productivo, y la vacunación ya que no es obligatoria. Según datos del año 2000 el 100% de los predios son seropositivos a BVDV, y una seroprevalencia promedio de 67% los rodeos (Guarino et al., 2008). En el año 2016 realizamos la primera caracterización molecular de BVDV en nuestro país de predios problemas reproductivos y se obtuvo una prevalencia del 4,1%, de acuerdo a lo esperado para predios con problemas reproductivos. El genotipo BVDV-1 fue el mayoritariamente encontrado y dentro de éste el subtipo 1a fue el predominante (98%) (Maya et al. 2016).

El objetivo de este trabajo es continuar la caracterización molecular de BVDV en Uruguay y comparar las cepas uruguayas con las de la región.

Materiales y Métodos

Colección de muestras:

Se colectaron alrededor de 928 muestras de sangre/ suero, muestras de diversos tejidos de animales muertos y fetos durante el periodo 2015-2017. La mayoría de las muestras fueron remitidas por la Plataforma de Salud Animal (PSA) de INIA, de terneros con y sin diarrea (Proyecto de Diarreas neonatales); animales abortados y vaquillonas (Proyecto de abortos), y de establecimientos con animales presuntamente positivos a BVDV.

Detección y caracterización molecular del Virus de la diarrea Viral Bovina:

Se extrajo el ARN viral de las muestras con el kit QIAamp viral RNA mini Kit (QIAGEN®, Germany). El ARN viral fue retrotranscrito con cebadores randómicos y la enzima SuperScript II (Invitrogen™, USA). Se realizó PCR en Tiempo Real descrita por Maya et al. (2016). Para la genotipificación se amplificó la 5'UTR y la proteasa Npro

tal como fue descrito previamente por Maya et al. (2016). Ambas hebras de los amplicones fueron secuenciadas y editadas. Las secuencias de la 5'UTR y Npro fueron concatenadas en un fragmento de 607 pb. La genotipificación de las cepas Uruguayas se realizó mediante una reconstrucción filogenética por Máxima Verosimilitud, y el modelo de sustitución nucleotídica GTR + gamma, y 1000 réplicas de bootstrap usando el software MEGA versión 6. En el análisis comparativo se incluyeron cepas de referencia de los genotipos y subtipos de BVDV obtenidas de la base de datos del Genbank.

Resultados y Discusión

Del total de muestras analizadas por PCR en Tiempo Real, 23 resultaron positivas a BVDV (2.5%). Por PCR a Tiempo final se amplificaron, secuenciaron y editaron exitosamente la 5' UTR y la Npro de 18 muestras, que pudieron ser genotipadas mediante reconstrucción filogenética en: 16 muestras como BVDV-1a y 2 como BVDV-2b. En las restantes 5 muestras positivas, solo se pudo amplificar la 5' UTR, haciéndose su genotipificación mediante la herramienta BLAST del NCBI, y se caracterizaron 3 muestras como BVDV-1a y 2 muestras como BVDV-2b.

Sumando a las cepas publicadas previamente por Maya et al. (2016) (n=16), las cepas uruguayas ascienden a 39 cepas positivas. Las secuencias de la 5' UTR y Npro concatenadas de 32 muestras fueron incluidas en los análisis comparativos. Estas cepas uruguayas fueron caracterizadas 28 como BVDV-1a, 1 BVDV-1i, y 3 BVDV-2b. La muestra del subtipo 1i se relaciona más estrechamente con la cepa de este subtipo aislada en Brasil en el año 2015 por Mosená et al. (2017) que con las cepas de este subtipo aisladas en el Reino Unido donde parecía estar restringido este subtipo viral.

Las cepas 1a Uruguayas se separaron en 2 grupos. En el grupo que contiene a la mayoría de las cepas 1a uruguayas (24 cepas) no se observa un agrupamiento temporal, y si una divergencia geográfica de este subtipo en nuestro territorio formando un nuevo linaje.

Las 3 muestras genotipadas como BVDV-2b también se subdividieron en 2 grupos: la cepa del año 2014 se agrupó de manera cercana con cepas de Brasil de este subtipo; mientras que

las cepas 2b del año 2016 agruparon aparte con buen soporte estadístico pudiendo denotar cierta divergencia local que por falta de un número mayor de muestras se hace menos evidente que en las cepas BVDV-1a.

Sería interesante continuar los análisis del linaje 1a uruguayo y estas cepas 1a del "linaje uruguayo" serían buenas candidatas para la formulación de vacunas para nuestros rodeos. Estos resultados contribuyen a la información para realizar planes de contingencia contra este virus

Bibliografía

- Flores, E. F., J. F. Ridpath, R. Weiblen, F. S. Vogel, and L. H. V. Gil, (2002). Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.* 87, 51–60.
- Guarino H, Núñez A, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med* 85:34–40.
- Jones LR, Zandomeni R, Weber EL (2001) Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Vet Microbiol* 81:367–375
- Maya, L.; Puentes, R.; Reolón, E.; Acuña, P.; Riet, F.; Rivero, R.; Cristina, J.; Colina, R. Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch. Virol.* 2016, 1613, 529–535.
- Mosená, A.C.; Weber, M.N.; Cibulski, S.P.; Silveira, S.; Silva, M.S.; Mayer, F.Q.; Canal, C.W. Genomic characterization of a bovine viral diarrhoea virus subtype 1i in Brazil. *Arch. Virol.* 2017, 1624, 1119–1123.
- Pecora A, Malacari DA, Ridpath JF, Perez Aguirreburualde MS, Combessies G, Odeón AC, Romero SA, Golemba MD, Wigdorovitz A (2014) First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res Vet Sci* 96:204–212
- Weber, M.N.; Streck, A.F.; Silveira, S.; Mosená, A.C.; Silva, M.S.; Canal, C.W. Homologous recombination in pestiviruses, identification of three putative novel events between different subtypes/genogroups. *Infect. Genet. Evol.* 2015, 30, 219–224.