

- Lorenz I, Mee JF, Earley B, More SJ. (2011). Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. *Irish Vet J*; 64:10.
- McGuirk SM. (2008). Disease management of dairy calves and heifers. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*; 24(1):139-153.
- Mee JF. (2008). Newborn dairy calf management. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*: 24:1-17.
- Meikle A. (2016). Dinámica de rodeo – informe preliminar 2 INALE. INALE, disponible en: www.inale.org.uy
- Raboisson D, Delor F, Cahuzac E, Gendre C, Sans P, Allaire G. (2013). Perinatal, neonatal, and rearing period mortality of dairy calves and replacement heifers in France. *J Dairy Sci*; 96:2913-2924.
- Rodríguez AR, Maiztegui JA, Allassia MA. (2011). Crianza artificial de terneros, un real desafío tecnológico. Fondo Editor Allignani 2da ed. Santa Fe, Argentina.
- Svensson C, Lundborg K, Emanuelson U, Olsson SO. (2003). Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and calf-level risk factors for infectious diseases. *Prev Vet Med*; 58:179-197.
- Louge Uriarte E, Cantón G, Morrel E, Moreira AR, Odéon A. (2017). En: Campero CM, Cantón G, Moore P. Abortos y otras pérdidas reproductivas en bovinas diagnóstico y control. Hemisferio Sur 2017. Capítulo 8: Muertes neonatales p 259-307.
- Wells SJ, Garber LP, Hill GW. (1996). Health status of preweaned dairy heifers in the United States. *Preventive Veterinary Medicine* 29 (1996) 185- 199.

Determinación de la prevalencia y variabilidad genética de Rotavirus, Coronavirus, Norovirus, Torovirus y Astrovirus en terneros neonatos de Uruguay

Castells M¹, Caffarena D², Casaux L², Schild C², Giannitti F², Miño S³, Riet-Correa F², Parreño V³, Colina R¹.

¹Laboratorio de Virología Molecular - CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria - La Estanzuela, Colonia, Uruguay. ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Castelar, Buenos Aires, Argentina. * mcastells@unorte.edu.uy.

Resumen

Las principales causas de muerte en terneros de hasta dos meses de edad reportadas a nivel mundial son las infecciones que causan diarrea neonatal y las neumonías infecciosas, siendo ambos síndromes de etiología múltiple. La diarrea puede ser provocada por diferentes agentes, siendo los más prevalentes a nivel mundial: *Rotavirus bovino del grupo A (RVA)*, *Coronavirus bovino (BCoV)*, *Escherichia coli* cepa K99+ y *Cryptosporidium parvum*; también son agentes infecciosos los *Norovirus bovinos (BoNoV)*, *Torovirus bovinos (BoToV)* y *Astrovirus bovinos (BoAstV)*. Conocer cuál es el estado de si-

tuación para RVA, BCoV, BoNoV, BoToV y BoAstV en Uruguay, es fundamental para poder tomar acciones frente a estos patógenos, y para esto es necesario tener un estudio exhaustivo con un elevado nivel de detalle epidemiológico molecular y evolutivo.

Summary

The main causes of death in calves up to two months of age reported worldwide are infections that cause neonatal diarrhea and infectious pneumonias, being both syndromes of multiple etiology. Diarrhea can be caused by different agents, the most prevalent worldwide: *group*

A bovine Rotavirus (RVA), Bovine Coronavirus (BCoV), *Escherichia coli* strain K99+ and *Cryptosporidium parvum*; also Bovine Norovirus (BoNoV), Bovine Torovirus (BoToV) and Bovine Astrovirus (BoAstV) are infectious agents. The knowledge of the sanitary situation of RVA, BCoV, BoNoV, BoToV and BoAstV in Uruguay is essential to be able to take actions against these pathogens, and for this it is necessary to have an exhaustive study with a high level of molecular and evolutionary epidemiological detail.

Introducción

La capacidad productiva de los bovinos puede verse afectada por varios motivos, en particular los terneros neonatos son susceptibles a diferentes enfermedades, principalmente de origen infeccioso, las cuales son causas de pérdidas económicas a nivel mundial. El estado de salud de los terneros en los primeros días de vida es fundamental para su supervivencia y posterior desarrollo (Waltner-Toews *et al.*, 1986). Las principales causas de muerte en terneros de hasta dos meses de edad reportadas a nivel mundial son las infecciones que causan diarrea neonatal y las neumonías infecciosas. Ambos síndromes son de etiología múltiple, frecuentemente con la participación de uno o más agentes infecciosos (virus, bacterias y/o protozoos) involucrado. Si bien estos dos síndromes tienen una base etiológica infecciosa, se debe considerar que están frecuentemente asociados a problemas nutricionales y/o inmunológicos causados por un deficiente calostrado (transferencia pasiva de inmunidad) y por factores ambientales y de manejo (humedad, temperatura, ventilación, hacinamiento, prácticas de alimentación, higiene/desinfección inadecuadas) durante la crianza artificial de los terneros, que favorecen la contaminación ambiental por los agentes causales o predisponen a los terneros a las infecciones (Blanchard, 2012). Para disminuir esas pérdidas es necesario conocer las causas de la mortalidad y los factores ambientales y de manejo que favorecen la ocurrencia y frecuencia de cada enfermedad. Con esa información es posible determinar medidas de control eficientes que redunden en una mayor productividad.

La diarrea puede ser provocada por diferentes agentes, siendo los más prevalentes a nivel mundial: Rotavirus bovino del grupo A (RVA), Coronavirus bovino (BCoV), *Escherichia coli* cepa

K99+ y *Cryptosporidium parvum* (Coura *et al.*, 2015; Al Mawly *et al.*, 2015). Además, los Norovirus bovinos (BoNoV, Woode y Bridger, 1978), los Torovirus bovinos (BoToV, Woode *et al.*, 1982), así como también los Astrovirus bovinos (BoAstV, Woode y Bridger, 1978) son agentes causales de diarreas en terneros.

Consideramos que es fundamental conocer cuál es el estado de situación para RVA, BCoV, BoNoV, BoToV y BoAstV en Uruguay, para tener un estudio exhaustivo con un elevado nivel de detalle epidemiológico molecular y evolutivo. El objetivo general del trabajo es determinar el grado de afectación existente en terneros neonatos provenientes de rodeos de carne y leche del Uruguay de rotavirus, coronavirus, norovirus, torovirus y astrovirus bovinos mediante estudios moleculares que permitan establecer la prevalencia y la variabilidad genética viral.

Materiales y Métodos

Se analizó un banco de 660 muestras de materia fecal de terneros con diarrea y sin diarrea, así como también 50 muestras de pool de intestinos y/o contenido intestinal. A todas las muestras se les realizó una suspensión al 10% en PBS. Se utilizó un tubo únicamente con PBS cada vez que se realizan suspensiones como control negativo (el cual fue utilizado a lo largo de todo el procesamiento de las muestras). Se utilizó un kit comercial para la extracción del ARN viral. Se utilizó la RT con hexámeros al azar, que permitió que el mismo ADNc obtenido sea utilizado para los diferentes virus, así como también para las diferentes regiones blanco de las distintas PCR. Como métodos de *screening*, se utilizó la PCR en tiempo real para RVA, BCoV, BoNoV y BoToV, y la PCR convencional para BoAstV. Los cebadores y sondas utilizadas fueron los publicados por Zeng y col. en 2008, un protocolo cedido por la Universidad de Minesotta para BCoV, por Wolf y col. en 2007 para BoNoV, y por Tsuchiaka y col. en 2016 para BoToV, mientras que los cebadores utilizados para BoAstV fueron los publicados por Tse y col. en 2011. La caracterización molecular de las estirpes virales para las muestras positivas se realizó por PCR convencional. Los cebadores utilizados fueron los publicados por Wolf y col. en 2007 para BoNoV, por Ito y col. en 2007 para BoToV, y por Tse y col. en 2011 para BoAstV. Los resultados de la amplificación por PCR fueron

visualizados en geles de agarosa. En base a los diferentes tamaños de los fragmentos de PCR fueron realizados los geles variando la concentración de agarosa entre 1 y 3 %, utilizando un marcador de peso molecular en cada caso para poder determinar los tamaños de las bandas. Todos aquellos productos de PCR positivos fueron purificados mediante la utilización de un kit comercial, directamente del producto de PCR o cortando la banda del gel en los casos donde se observó amplificación inespecífica, y luego fueron enviados a secuenciar a Macrogen™. Los cromatogramas recibidos de Macrogen, fueron editados mediante la utilización del programa SeqMan del paquete DNASTAR Lasergene y éstas secuencias editadas fueron alineadas según el análisis posterior a ser realizado, ya sea con secuencias de referencia bajadas de la base de datos Genbank, así como también con otras secuencias de la región y el mundo, para cada virus en particular. Se realizaron árboles filogenéticos con el objetivo de confirmar la presencia de éstos virus en Uruguay, así como también para determinar su variabilidad genética mediante la determinación de los genotipos, subtipos y/o linajes que circulan en nuestro país.

Resultados y Discusión

Se confirmó la circulación de los 5 virus, con una prevalencia de: 60% rotavirus, 7% coronavirus, 71% norovirus, 9% torovirus y 26% astrovirus. Los análisis filogenéticos demostraron una gran diversidad de linajes circulando en el ganado uruguayo para los 5 virus analizados. En el caso de Rotavirus, detectamos la circulación de los G-tipos G6, G10 y G24, y los P-tipos P[5], P[11] y P[33]. Particularmente interesante fue la detección del genotipo G24P[33], una combinación únicamente descrita en un caso, en un establecimiento en Japón. En el caso de Coronavirus, si bien existe un único genotipo, se detectó la circulación de dos linajes genéticamente distintos, uno de ellos muy distante filogenéticamente a la cepa vacunal, pero muy relacionada con una cepa Argentina para la cual se confirmó que existe neutralización cruzada con la cepa vacunal. En el caso de Norovirus, se detectó la circulación de los dos genotipos existentes en el genogrupo III. En el caso de Torovirus, se detectó la circulación de dos linajes distintos, mientras que para Astrovirus se

detectó la circulación de 3 especies distintas de *Mamastrovirus*, una de ellas nueva, sin especie asignada hasta el momento por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus.

Conclusión

Los 5 virus analizados están presentes en nuestro país, con una elevada variabilidad genética, lo que indica que existieron varios ingresos de los virus al país, y que además estos virus se han dispersado en el ganado uruguayo.

Bibliografía

- Al Mawly J, Grinberg A, Prattley D, Moffat J, French N. Prevalence of endemic enteropathogens of calves in New Zealand dairy farms. *N Z Vet J.* 2015 May;63(3):147-52.
- Blanchard PC. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2012 Nov;28(3):443-64.
- Coura FM, Freitas MD, Ribeiro J, de Leme RA, de Souza C, Alfieri AA, Facury Filho EJ, de Carvalho AU, Silva MX, Lage AP, Heinemann MB. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Trop Anim Health Prod.* 2015 Jan;47(1):3-11.
- DICOSE, 2016. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/indicadores-basados-en-la-declaracion-jurada-anual-de-existencias-dicose-snig-2016>
- DIEA, 2016. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>
- Ito T, Okada N, Fukuyama S. Epidemiological analysis of bovine torovirus in Japan. *Virus Res.* 2007 Jun;126(1-2):32-7.
- Tse H, Chan WM, Tsoi HW, Fan RY, Lau CC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. Rediscovery and genomic characterization of bovine astroviruses. *J Gen Virol.* 2011 Aug;92(Pt 8):1888-98.
- Tsuchiaka S, Masuda T, Sugimura S, Kobayashi S, Komatsu N, Nagai M, Omatsu T, Furuya T, Oba M, Katayama Y, Kanda S, Yokoyama T, Mizutani T. Development of a novel detection system for microbes from bovine diarrhea by real-time

PCR. *J Vet Med Sci.* 2016 Mar;78(3):383-9.

• Waltner-Toews D, Martin SW, Meek AH. The effect of early calthood health status on survivorship and age at first calving. *Can J Vet Res.* 1986 Jul;50(3):314-7.

• Wolf S, Williamson WM, Hewitt J, Rivera-Aban M, Lin S, Ball A, Scholes P, Greening GE. Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Sep;73(17):5464-70.

Woode GN, Bridger JC. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol.* 1978 Nov;11(4):441-52.

• Woode GN, Reed DE, Runnels PL, Herrig MA, Hill HT. Studies with an unclassified virus isolated from diarrheic calves. *Vet Microbiol.* 1982 Jul;7(3):221-40.

• Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* 2008 Nov;153(2):238-40.