



Encuentro  
de JÓVENES  
INVESTIGADORES

## SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE CEPAS DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA HALLADAS EN LA PROVINCIA DE SANTA FE, ARGENTINA

**Talamé, María Paz**

*Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias UNL*

*Directora: Paula Favaro*

*Co-Directora: Betina Mariño*

Área: Ciencias biológicas

Palabras claves: Diarrea viral bovina, Secuenciación, Filogenia.

### INTRODUCCIÓN

La Diarrea Viral Bovina es una enfermedad infecciosa que afecta a bovinos a nivel mundial, caracterizada principalmente por trastornos reproductivos y respiratorios, que conllevan importantes pérdidas económicas, debidas a disminución en la producción de leche, abortos, malformaciones y mortalidad embrionaria, inmunosupresión e incremento en las infecciones secundarias, diarreas, síndromes respiratorios, entre otros. Esta enfermedad es producida por el virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB).

**Título del proyecto:** “Herramientas diagnósticas para el control de la Diarrea Viral Bovina en rodeos lecheros de la provincia de Santa Fe”.

**Instrumento:** CAID.

**Año convocatoria:** 2020

**Organismo financiador:** UNL.

**Director/a:** Betina Mariño



Federación  
Universitaria  
del Litoral

100



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DEL LITORAL

El VDVB pertenece a la Familia Flaviviridae, clasificado dentro del Género Pestivirus, al igual que el virus de la Peste Porcina Clásica y al de la Enfermedad de las Fronteras. En la actualidad se conoce la existencia de 3 genotipos del VDVB: VDVB-1, VDBV-2 y el último en detectarse, el virus HoBi-Like o VDVB-3 (también llamados Pestivirus A, Pestivirus B, y Pestivirus H, respectivamente). A su vez, dentro del genotipo 1 hay 21 sub-genotipos, los cuales se denominan desde la “a” a la “u”. Dentro del genotipo 2 se describen cuatro subgenotipos, denominados desde la “a” a la “d” (Yeşilbaş, Alpay y Becher, 2017) y dentro del genotipo 3 o HoBi-Like se conocen 4 subgenotipos denominados de la “a” a la “d”. En Argentina se han detectado cepas pertenecientes al genotipo 1a, 1b, 1e, 1i, 2a, 2b, 2d y HoBiLike (genotipo 3a) (Spetter, et al., 2021; Jones, Zandomeni y Weber, 2001), pero se desconoce cuáles son los genotipos que circulan actualmente en la provincia de Santa Fe.

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue secuenciar cepas provenientes de casos clínicos hallados en la provincia de Santa Fe con el fin de determinar a qué genotipo pertenecen mediante la realización de un estudio filogenético y de esta forma establecer qué genotipos circulan con mayor frecuencia en la provincia de Santa Fe. La importancia de dicha información radica en que se ha reportado que las variaciones del virus representan una importante causa de falla vacunal.

## METODOLOGIA

Para realizar la filogenia y determinación del genotipo se evaluaron las secuencias obtenidas de 11 cepas del VDVB durante el periodo 2020 a 2022 (Tabla 1).

Para la realización del trabajo, las muestras analizadas fueron proporcionadas por productores a la Facultad de Ciencias Veterinaria UNL, Laboratorio de Virología. Dichas muestras fueron tomadas de animales que presentaban signología compatible con Diarrea Viral Bovina. Los establecimientos de los cuales provinieron las muestras se ubican en Arteaga (Dpto. de Caseros), Carcaraña (Dpto. San Lorenzo), Esperanza (Dpto. Las Colonias) Sarmiento (Dpto. Las Colonias), Portugalete (Dpto. San Cristóbal).

Para la caracterización filogenética, las muestras obtenidas se sometieron a una RT-PCR de punto final. Se cortaron y purificaron las bandas de agarosa con un kit comercial (GE) y luego se secuenció el fragmento 5'UTR de los VDVB encontrados.

Para el análisis filogenético, en un primer paso se alinearon y analizaron las secuencias con el programa Bioedit (Hall, 1999) 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 (GQ898885CSFV Nchills). Una vez obtenida la matriz, se realizaron alineamientos múltiples utilizando el programa Clustal X Versión 1.8.3 (Thompson, Higgins y Gibson, 1994) y consecuentemente se realizó la matriz de distancia bajo el método Kimura 2 parámetros. Los dendrogramas se realizaron con el método Neighbor Joining utilizando el programa Mega (Nei y Saitou, 1987), versión X y se calcularon los bootstrap con 1000 repeticiones. Las secuencias nucleotídicas obtenidas en este trabajo se cargaron a la base de datos de *GenBank*.

Tabla 1. Nombre, departamento de procedencia y cuadro clínico de las cepas secuenciadas. EM: Enfermedad de las mucosas

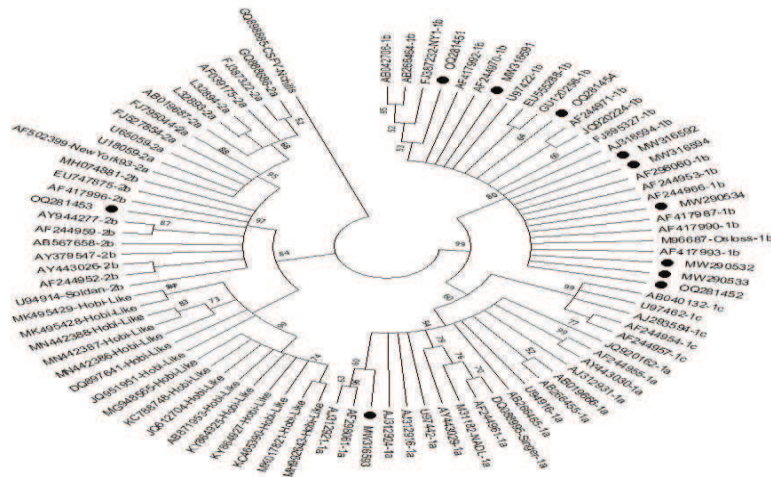
NOMBRE	DEPARTAMENTO	SIGNOS CLINICOS
18	Caseros	Neumonía
84	San Lorenzo	Neumonía
85	San Lorenzo	Neumonía
89	Las Colonias	Muerte perinatal
IC	Las Colonias	Natimorto
S.2	San Cristóbal	EM
CD22	San Cristóbal	Malformación
L3	San Cristóbal	Infección inaparente
PA1	Las Colonias	EM
SA1	Las Colonias	EM
N.T	Las Colonias	Natimorto

## CONCLUSION Y RESULTADOS

A partir de la secuenciación de las cepas anteriormente nombradas se puede establecer un árbol filogenético (Figura 1), donde se ubican las cepas secuenciadas y las cepas usadas como referencia de cada genotipo. Los datos sobre la secuenciación obtenidos fueron compartidos en el *Genbank*, junto con información como la procedencia, fecha de toma de muestra y signos encontrados. Como puede observarse en el árbol filogenético, 9 de las 11 cepas secuenciadas pertenecen al genotipo 1b y las 2 restantes pertenecen al genotipo 2b y 1a. Estos resultados son semejantes a los observados en estudios previos en la región pampeana, donde la mayoría de las cepas aisladas fueron del genotipo 1b (Pecora et al., 2014).

Este estudio permitió determinar qué genotipo del VDVB es el más frecuente en la provincia de Santa Fe. Conocer las cepas que circulan en nuestra zona es útil a la hora del desarrollo de

vacunas y métodos diagnósticos y en la toma de decisiones al momento de planificar medidas de control de la diarrea viral bovina.



**Figura 1:** Árbol filogenético que incluye cepas de los genotipos 1a, 1b, 1c, 2a, 2b y virus HoBi-Like, nombradas con su nro. de acceso a *GenBank*. Los círculos negros indican las cepas que fueron secuenciadas en el presente trabajo

### BIBLIOGRAFIA

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98

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

Nei, M., Saitou, N., (1987). The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.

Pecora, A., Malacari, D.A., Ridpath, J.F., Perez Aguirreburualde, M.S., Combessies, G., Odeón, A.C., Romera, S.A., Golemba, M.D., Wigdorovitz, A., (2014). First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Research in Veterinary Science*, 96, 204–212.

Spetter, M., Louge Uriarte, E., Verna, A., Leunda, M., Pereyra, S., Odeón, A. y González Altamiranda, E. (2021). Genomic diversity and phylodynamic of bovine viral diarrhoea virus in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 96, 1-8

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.

Yeşilbağ, K., Alpay, G., Becher, P., (2017). Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Viruses* 9, 1–19.