

RECOPIACION DE RESULTADOS DE LA TECNICA RT-PCR A PARTIR DE MUESTRAS DE ANIMALES CON SIGNOLOGIA CLINICA COMPATIBLE CON DIARREA VIRAL BOVINA

ESTRADA JOAQUIN

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral

Director/a: Mariño, Betina
Codirector/a: Favaro, Paula

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: diarrea viral bovina, VDVB, RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

La diarrea viral bovina (DVB) es una enfermedad infectocontagiosa, de distribución mundial que además de bovinos afecta a una gran diversidad de especies animales, entre ellos búfalos, ovinos, llamas, alpacas. Es responsable de grandes pérdidas económicas desde el punto de vista productivo que se deben a la disminución en la producción láctea; menor tasa de concepción; abortos, malformaciones, retraso del crecimiento, y nacimientos de terneros persistentemente infectados (IP), que suelen tener menor desarrollo corporal, y mayor susceptibilidad a contraer otras enfermedades. Además, es responsable de otros trastornos, entre ellos respiratorios, digestivos y la muerte de aquellos animales que padezcan la infección aguda.^{4, 3}

El agente etiológico pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. Un virus envuelto cuyo genoma es ARN de cadena simple con polaridad positiva.¹ Genéticamente se lo clasifica en tres genotipos principales (I, II y HoBi-like) y en dos biotipos, citopático (CP) y no citopático (NCP). Los virus CP son aquellos que producen efecto citopático en cultivos celulares y los NCP aquellos que no generen dicho efecto.³ De ambos, este último es el de mayor relevancia epidemiológica, debido a que, si se infecta una hembra preñada en el primer trimestre de la gestación con este biotipo, se infectará el feto y generará la infección persistente (IP) del mismo, lo cual es crucial en el ciclo viral, ya que los animales que nacen con IP son reservorio del virus de por vida y la principal fuente de diseminación del mismo.^{2,5}

Título del proyecto: Monitoreo y saneamiento del virus de la Diarrea Viral Bovina en establecimientos lecheros de la provincia de Santa Fe Año convocatorio: 2020 Organismo financiador: UNL Director/a: Mariño, Betina
--

Por su parte, el biotipo CP es responsable de generar la enfermedad de las mucosas por una reinfección en animales con infección persistente. El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) además produce inmunosupresión, afecciones intestinales, respiratorias, síndrome hemorrágico,



trastornos congénitos y reproductivos.^{1,2}

La transmisión del virus puede ser de manera horizontal, cuando animales susceptibles entran en contacto con secreciones de otros que padezcan la IP o infección transitoria, de manera directa e indirecta; como de forma vertical mediante la infección intrauterina.¹

En este trabajo se recopilan y analizan los resultados obtenidos mediante la técnica RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción) a partir de muestras de líquidos y tejidos provenientes de bovinos con sinología compatible con DVB, llevada a cabo en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (FCV-UNL)

OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio fue recopilar y analizar los resultados obtenidos tras realizar la técnica RT-PCR para la detección del VDVB en muestras de líquidos y tejidos de bovinos con sinología clínica compatible con DVB.

METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el trabajo, desde agosto del año 2019 hasta julio de 2024 se obtuvieron muestras de bovinos con sinología compatible con DVB. Todas fueron remitidas al Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral por parte de veterinarios privados y por el Hospital Escuela de Grandes Animales de la FCV-UNL. Se obtuvieron 175 muestras, provenientes de 172 animales (fetos abortados, natimortos, terneros, vaquillonas, vacas, toros, cordero), oriundos de la provincia de Santa Fe, Argentina. Consistieron en muestras de animales vivos: suero, plasma, sangre entera, líquido cefalorraquídeo; y de animales muertos: bazo, hígado, pulmón, ganglios, timo, cerebro, y cartílago de oreja. Todas fueron sometidas a la reacción de RT-PCR para la detección de ácido nucleico viral del VDVB, y luego según su resultado se las clasifico en: “positivas” y “negativas”. Además, se las subclasificó en función de qué tipo de líquidos o tejidos representaba la muestra.

Para llevar a cabo la reacción RT-PCR se usó como control positivo una alícuota de suero fetal bovino contaminada con VDVB. Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas. Los cebadores utilizados en la RT-PCR fueron descriptos por Vilček en 1994⁶ y permiten amplificar una secuencia de 288 pares de bases (pb) correspondiente al sector 5'UTR del genoma del VDVB3. Los cebadores contienen las siguientes secuencias: ATG CCCTTA GTA GGA CTA GCA (324 Forward) y TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC (326 Reverse).

Para la extracción de ARN, se utilizó el método TRIzol (TRIzol LS Reagent, Invitrogen) según recomendaciones del fabricante. El ARN extraído se almacenó a una temperatura de -80°C hasta su procesamiento. Para la reacción de retrotranscripción, por cada tubo de reacción, se utilizaron 5µl de buffer de MMLV, 1µl de mezcla de dNTP (Promega), 0.5 µl del cebador (326), 0.25µl de enzima MMLV (Promega), 13.25 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl del ARN extraído. En el termociclador (TECHNE TC-3000) se realizó un programa consistente en: 30 minutos a 42°C y 7 minutos a 95°C. Para la reacción de PCR se utilizaron los cebadores 324 y 326 en una mezcla compuesta por 5 µl de buffer Taq, 0.5 µl de MgCl₂, 1µl de cada cebador, 0.5 µl de mezcla de dNTP, 0.25 µl de enzima GoTaq Polimerasa (Promega), 11.75 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl del ADN complementario obtenido en el paso anterior. En el termociclador, el programa

consistió en un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por un minuto, alineamiento a 55°C por un minuto y extensión a 72°C por un minuto. Finalmente, un paso de extensión a 72°C por 7 minutos. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis, usando un gel de agarosa al 1,5% con tinción de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen), esperando detectar un producto de 288 pares de bases (pb) correspondiente a un fragmento del sector 5' UTR del genoma del VDVb. Dichos productos fueron visualizados en transiluminador (Safe Imager 2.0, Invitrogen). Para comparar el tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador de peso molecular (CienMarker, Biodynamics) desde 100 a 1000 pb con incrementos de 100 pb. Para que una muestra se considere positiva, debe visualizarse una banda de amplificación coincidente con la del control positivo, a la altura de 288 pb respecto al marcador de peso molecular. Las muestras negativas se observaron como la ausencia de bandas de amplificación.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

De las muestras analizadas mediante la técnica de RT-PCR para la detección del VDVb, el 17,15% (30 de 175) resultaron positivas, mientras que el 82,85% (145 de 175) resultaron negativas.

En relación a las muestras positivas, 21 eran de suero (70%); 2 de bazo (6,6%); 2 de sangre entera (6,6%); 2 de plasma (6,6%); 1 de LCR (3,3%); 1 de cerebro (3,3%); y 1 de *pool* de bazo y pulmón (3,3%); Por su parte, las que resultaron negativa, 96 fueron muestras de suero (66,2%); 34 de bazo (23,45%); 2 de LCR (1,38%); 4 de hígado (2,75%); 2 de cartílago de oreja (1,38%); y 7 de *pooles* de órganos varios (4,83%).

El diagnóstico etiológico de esta enfermedad tan prevalente en nuestro país (en 70-100% de los rodeos se puede detectar la circulación del VDVb) es de suma importancia debido a las grandes pérdidas económicas que genera en la producción pecuaria.⁵ Es fundamental la detección e identificación de los animales con IP para su eliminación, y así disminuir en gran medida el riesgo de transmisión del VDVb dentro y entre los establecimientos, ya que estos excretan virus de manera constante mediante diferentes fluidos, siendo la principal fuente de diseminación del virus. Para la detección de estos animales se debe confirmar dos veces consecutivas la presencia del virus en un muestreo pareado con 3-4 semanas de diferencia. Esto se puede lograr a partir de las muestras mencionadas anteriormente en el presente trabajo o a partir otras, como semen e hisopados nasales u oculares.⁷

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- **Andrea P., Pérez, Aguirreburualde, M. S.** (2017). Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención. INTA. <https://es.studenta.com/content/115142592/inta-actualizacion-en-diarrea-viral-bovina> (7)
- **Hans H.**, (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies [Impacto económico de la infección por BVDV en las lecherías]. Biologicals, Volume 31, Pages 137-143, ISSN 1045-1056, [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00030-7) (4)
- **Maclachlan N. J. y Dubovi E. J.** (2011). Fenner's veterinary virology [Virología veterinaria de fenner] (4 ed). Elsevier. United States of America. (3)
- **Odeon, A. C.** S.F. Diarrea viral bovina. Unidad Integrada Balcarce. EEAB. <https://es.studenta.com/content/146980520/diarrea-viral-bovina-a-odeon-2019> (5)

- **Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., Hinchcliff, K. W.,** (2002). Medicina Veterinaria, Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid. (2)
- **Stanchi, N. O.** (2007). Microbiología Veterinaria. Intermedica. Buenos Aires. (1)
- **Vilcek, S.; Herring, AJ.; Herring, JA.; Nettleton, PF.; Lowings, JP.; Paton, DJ.** (1994). Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis [Los Pestivirus aislados de cerdos, bovinos y ovinos se pueden asignar en al menos tres genogrupos mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de endonucleasas de restricción]. Archives of Virology, 136:309-323. (6)