

**Presencia y caracterización genotípica del virus de la diarrea viral bovina (BVDV) en
animales persistentemente infectados (PI) en regiones de Colombia**

Juan Sebastián Quintero Barbosa

Trabajo de grado presentado para optar por el título de Biólogo

Director:

María Fernanda Gutiérrez

PhD. en ciencias biológicas

Codirector:

Adriana Corredor

MSc, en ciencias biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2018

Contenido

	Pág.
Introducción	12
1. Objetivos	14
1.1. Objetivo General	14
1.2 Objetivos Especificos.....	14
2. Marco Teórico.....	15
2.1 Epidemiología	15
2.2. Características del virus	16
2.2.1. Replicación Viral	17
2.2.2. Proteínas virales	18
2.2.2.1 Proteínas estructurales	18
2.2.2.2 Proteínas no estructurales	18
2.2.3 Clasificación	19
2.2.3.1 Biotipos virales	19
2.2.3.2 Genotipos virales	19
2.3 La enfermedad	20
2.3.1. Presentación aguda de la infección por BVDV	20
2.3.2. Infección persistente	20
2.3.3. Enfermedad de las mucosas	21
2.4 Métodos de transmisión y factores de riesgo.....	21

2.5. Métodos diagnósticos.....	22
2.5.1. Detección de antígeno.....	22
2.5.1.1. Detección directa de Antígeno.....	22
2.5.2. Detección de anticuerpos específicos	22
2.5.2.1. Seroneutralización.....	22
2.5.2.2. ELISA indirecta y competitiva	23
2.5.3. Detección de genoma.....	23
2.6. Control y prevención.....	23
2.6.1. Control sistemático sin vacunación	23
2.6.2 Control sistématico con vacunación	24
2.6.2.1. Vacunas Inactivadas.....	24
2.6.2.2. Vacunas virus vivo modificado (VLM).....	24
3. Materiales y Métodos.....	25
3.1. Cálculo y recolección de muestras.....	25
3.2. Extracción de ARN.....	26
3.3. puesta A punto de técnica de RT-PCR para la detección de BVDV	26
3.4. Ensayo de sensibilidad de la PCR.....	27
3.5. RT-PCR detección de BVDV	28
3.6. Genotipificación y secuenciación	29
3.6.1. Análisis de secuencias.....	29
4. Resultados.....	31
4.1 Puesta a punto de técnica de RT-PCR para la detección de BVDV	31
5. Discusión.....	37

6. Conclusión	40
Referencias Bibliográficas	41
Apéndices.....	50

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1</i> A. Gel representativo de estandarización de la RT-PCR para detección de un fragmento del genoma ubicado en la región 5'UTR y el inicio de la secuencia codificante para la proteína Npro. B. Prueba de sensibilidad de la RT-PCR para detección de fragmento del genoma ubicado en la región 5'UTR y el inicio de la secuencia codificante para la proteína Npro. Pozo 1, marcador de peso molecular de 100pb, pozo 2 plásmido puro, pozos del 3 al 7 diluciones seriadas del plásmido (1/10, 1/100, 1/1000, 1/100000). Se observa que la mínima concentración detectada que se logra amplificar con la PCR descrita es de 12,68 pg/ul, correspondiente a la dilución 1/10 ⁴	32
<i>Figura 2.</i> Positividad por departamento para el BVDV de animales PI. Sucre (Verde) 1%, Antioquia (Morado) 13%, Cauca (Rojo) 9%, Huila (Naranja) 10% y Caquetá (Azul) 10%, Para un total de 7% de prevalencia de PI de BVDV en Colombia.	33
<i>Figura 3.</i> Reconstrucción Filogenética 5'UTR y Npro de BVDV en PI.....	35

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Primers empleados para la amplificación y secuenciación de un fragmento del genoma ubicado en la región 5'UTR y el inicio de la secuencia codificante para la proteína Npro.....</i>	27

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Protocolo extracción del cartilago de oreja en bovinos	50
Apéndice B. Analisis bioinformatico de los primers 324F y 326 R. Tamaño esperado 288pb....	51
Apéndice C. Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la RT-PCR	52
Apéndice D. Secuencias de referencia utilizadas en la construcción de la filogenia.	53
Apéndice E. Secuencias colombianas de BVDV de este estudio sometidas al Genbank.....	54
Apéndice F. Resultados de la búsqueda del mejor modelo evolutivo para el dataset	55
Apéndice G Tabla mostrando la información de animales y predios muestreados por departamento.....	56

Resumen

TÍTULO: PRESENCIA Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (BVDV) EN ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI) EN REGIONES DE COLOMBIA*.

AUTORES: Juan Sebastián Quintero Barbosa**

PALABRAS CLAVE: diarrea, viral, bovino, persistencia, infección, prevalencia, genotipos

DESCRIPCIÓN:

El virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV de su nombre en inglés Bovine Viral Diarrea Virus) es un patógeno asociado con enfermedades gastrointestinales, respiratorias y reproductivas del ganado en todo el mundo. Causa pérdidas económicas continuas a la industria ganadera principalmente debido a la disminución del rendimiento reproductivo. El BVDV es capaz de establecer una infección persistente después de la infección fetal, logrando una permanente circulación, de modo que los animales persistentemente infectados (PI) son generalmente transmisores de BVDV de manera mucho más eficiente que los animales infectados transitoria o agudamente. Esto dado por la capacidad que tiene el animal infectado de excretar grandes cantidades de virus a lo largo de su vida, convirtiéndose así en el reservorio primario para BVDV.

En este trabajo se detectó la presencia de animales PI en diferentes regiones de Colombia utilizando técnicas de RT-PCR y más adelante, con la secuenciación de un segmento de la región 5 UTR y del gen que codifica para la proteína Npro, se determinó el genotipo viral. Dentro de los resultados se encontró una prevalencia del 7% por animal, 22% por predios y la presencia del genotipo 1 como único genotipo para la totalidad de las muestras secuenciadas. Este es el primer estudio realizado en Colombia en el que se muestra una prevalencia superior a la reportada en el resto del mundo, resultado de gran importancia para los ganaderos, los productores de vacunas y los entes gubernamentales.

* Trabajo de Grado.

** Facultad de Ciencias Escuela de Biología Director: María Fernanda Gutiérrez MSc, PhD. Codirector: Adriana Corredor MSc, cPhD.

Abstract

TITLE: PRESENCE AND GENOTYPICAL CHARACTERIZATION OF VIRUS OF THE BOVINE VIRAL DIARRHEA (BVDV) IN PERSISTENTLY INFECTED ANIMALS (PI) IN REGIONS OF COLOMBIA *

AUTHORS Juan Sebastián Quintero Barbosa **

KEYWORDS: diarrhea, virus, bovine, persistence, prevalence, genotype, infection

DESCRIPTION:

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a pathogen associated with gastrointestinal, respiratory and reproductive diseases of cattle worldwide. It causes continuous economic losses to the livestock industry mainly due to the decrease of reproductive performance. BVDV is capable of establishing a persistent infection after a fetal infection thus achieving a permanent circulation so that the persistently infected animals (PI) are generally much more efficient BVDV transmitters than transiently infected animals. This is given by their capacity to excrete large amounts of virus throughout their lives.

In this work, the presence of PI animals was detected in different regions of Colombia using RT-PCR techniques. Later, the viral genotype was determined with both the sequencing of a segment of the 5' UTR region and the gene that codes for the Npro protein. Within the results, it was found a prevalence of 7% per animal and 22% per farms. Additionally, the presence of genotype 1 as the only genotype for all the sequenced samples was established. This is the first study conducted in Colombia which results show a higher prevalence than other studies that reported in the rest of the world. This result is of great importance for farmers, vaccine producers, and government agencies.

* Degree Paper.

** Facultad de Ciencias Escuela de Biología Director: María Fernanda Gutiérrez MSc, PhD. Codirector: Adriana Corredor MSc, cPhD

Introducción

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) es uno de los agentes infecciosos de mayor importancia para el ganado bovino. Este virus presenta una distribución global y es endémico en la mayoría de las poblaciones, con niveles de seroprevalencia reportados entre el 40 y el 80% en promedio mundial y de entre un 50 y un 58% para Colombia en el año 2004 (Castañeda, 2004).

La naturaleza infecciosa del virus ha tenido como consecuencia grandes pérdidas económicas principalmente de origen reproductivo, notorias en las industrias lácteas y cárnicas. Estas pérdidas tienen relación con el aumento de abortos y disminución de la calidad del semen, problemas respiratorios y digestivos disminuyen la ganancia de peso en producción de corrales de engorde (producción de carne), así como en el dinero invertido en animales enfermos y pérdidas en la producción (Houe, 2003). En Estados Unidos, las pérdidas económicas atribuidas al BVDV han sido estimadas entre 20 a 58 millones de dólares por cada millón de terneros (Houe, 2003). En Colombia, no se han estimado las pérdidas económicas causadas por BVDV, pero si se han determinado de forma general las ocasionadas por las enfermedades reproductivas, siendo de 44.000 millones de pesos anuales; donde se sospecha que la BVDV tiene mucha responsabilidad debido a su alta seroprevalencia en los hatos colombianos.

La infección con BVDV en ganado vacuno puede presentarse clínicamente causando uno de estos tres síndromes: como una infección aguda donde los síntomas son la diarrea, problemas respiratorios y reproductivos, como una infección persistente y, la forma más agresiva que es la llamada enfermedad de las mucosas (Potgieter, 1997).

Respecto al virus, este se comporta de forma lítica, lo que lleva a una multiplicación viral, con eliminación de muchos virus a partir de la célula infectada, lo cual se conoce como biotipo citopático (cp) y de forma contraria, hay cepas virales que no destruyen la célula y se conocen como no citopáticos (ncp).

La presentación aguda es la manifestación clásica de la enfermedad. En este caso el animal se puede infectar con un biotipo citopático (CP) o no citopático (NCP) y desarrollar problemas respiratorios, digestivos, reproductivos y en algunos casos una infección mortal por síndrome hemorrágico por ejemplo con BVDV-2 (Baker, 1995; Baule et al., 2001; Potgieter, 1997). La infección fetal o infección persistente (PI) es el síndrome que presentan los animales infectados durante la gestación, entre los 35 a 125 días de gestación. Esta patología está asociada con la infección del biotipo ncp, convirtiendo a estos animales en los primeros reservorios del virus (Campbell, 2004). Finalmente, la enfermedad de las mucosas se desarrolla en animales PI que adquieren una cepa citopática, desarrollando en el animal una sintomatología que se asocia con diarrea aguda, baja morbilidad y alta mortalidad (Baule et al., 2001; Campbell, 2004).

Los programas de control empleados en los diferentes países se fundamentan en gran medida en la eliminación de la principal fuente de infección que son los animales PI, que se caracterizan por no presentar anticuerpos contra el virus pero si eliminarlo en grandes cantidades, por lo cual se constituyen en reservorios asintomáticos de la enfermedad (Lindberg et al., 1999). Bajo este esquema se ha erradicado la enfermedad en la región escandinava (Dinamarca, Finlandia, Suecia y Noruega) (Gates et al., 2014).

En Colombia, pocos estudios de este virus han sido publicados. En 1975, se reportó la presencia del virus después de la entrada de terneros infectados importados de los Países Bajos (Borda, 1975). Más tarde, en la década de 1990, se publicó un informe de caso de enfermedad de la mucosa

en el que se identificaron los biotipos de NCP y CP del virus (Vargas et al., 2009). Además, en 1994 se publicó un estudio realizado en pueblos cercanos a Bogotá con un 89% de animales seropositivos en una población de 101 bovinos. Este estudio también mostró coinfecciones con otros patógenos como el virus de la leucemia bovina (BLV) y *Leptospira* sp (Parra, 1994). No obstante, en ninguno se ha incluido la búsqueda de animales PI, por tal motivo el objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de animales persistentemente infectados con BVDV así como la identificación del genotipo circulante de este en ganado vacuno de diferentes regiones de Colombia.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Detectar la presencia y caracterizar genotípicamente el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) en animales persistentemente infectados (PI) en regiones de Colombia

1.2 Objetivos Especificos

1. Detectar la presencia de PI de BVDV en ganado vacuno en Colombia.
2. Determinar los genotipos circulantes de BVDV en animales PI en Colombia.

2. Marco Teórico

2.1 Epidemiología

El BVDV fue reconocido por primera vez en Estados Unidos por Olafson y colaboradores en 1946, en hatos con síndrome agudo caracterizado por fiebre, diarrea, anorexia y tos (Baker, 1995). Ramsay y Chivers en 1953, describieron una enfermedad esporádica que se caracterizaba por diarrea, ulceraciones en la mucosa del tracto digestivo y una mortalidad del 100%. Posteriormente se determinó que los dos síndromes eran provocados por el mismo virus (Baker, 1995). A finales de los años 60 se describieron los dos biotipos virales, el CP y el NCP, dependientes de su habilidad de causar o no el efecto de muerte celular en cultivos celulares (Benfelt et al., 2003).

De manera independiente al comportamiento del virus en las células, los avances en la secuenciación genética permitieron establecer que existen dos genotipos virales, el 1 y 2, caracterizados por las diferencias presentadas en la región 5'UTR y en la región codificante para la proteína E2 (Ridpath et al., 1998).

Recientemente se ha descrito la presencia de un tercer genotipo caracterizado por primera vez partir de aislamientos en suero fetal bovino contaminado y de un búfalo PI en Brasil y después en bovinos de diferentes países del mundo. Este nuevo genotipo difiere a los genotipos 1 y 2 de acuerdo con las regiones del genoma 5'UTR, Npro y E2 (Liu et al., 2009; Silvieira et al., 2017)

En Colombia los primeros reportes de la enfermedad se registraron en 1975 después de una importación de ganado enfermo procedente de Holanda (Borda, 1975) y desde entonces, se han

realizado diferentes estudios en el país que muestran su presencia. En 1981, Gallego y colaboradores evidenciaron la presencia de la enfermedad en un hato de la sabana de Bogotá, en 1990. Mogollón y colaboradores reportaron por primera vez en el país un caso de la enfermedad de las mucosas en 1992, Vera y colaboradores realizaron estudios sobre el BVDV como agente contaminante en cultivos celulares de tejidos animales y dos años después, realizaron otro estudio buscando la seropositividad de 101 animales en fincas de la sabana de Bogotá encontrando una presencia de anticuerpos en el 89% de los animales estudiados (Parra, 1994). Finalmente el grupo del Dr. Jaime en 1996 determinó la presencia de animales PI en hatos lecheros de la sabana de Bogotá mediante la detección viral a partir de cultivo de linfocitos (Vargas et al., 2009). Con el pasar de los años no se conoce cuál es la situación actual del país, pero se estima que podría estar en el mismo intervalo de la seroprevalencia mundial la cual oscila entre 40-90% (Castañeda, 2004), adicionalmente en Colombia tampoco se ha estimado la prevalencia de animales PI que en el mundo oscila entre 0.5 y 2% (Houe, 1999), ni el genotipo predominante circulante.

2.2. Características del virus

El BVDV es miembro del género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* al igual que el virus de la enfermedad de las fronteras de las ovejas (BDV de su nombre en inglés Border Disease Virus) y el virus de la peste porcina clásica (CSFV Classical swine fever virus) y otros virus aislados de rumiantes silvestres (Girrafe, HoBi, etc) (Brodersen, 2014; Hamers et al., 2001; ICTV, 2014) y como los demás *Pestivirus*, estos son capaces de infectar a diferentes especies pertenecientes al orden de los artiodáctilos (animales de uña hendida) (Hamers et al., 2001).

El genoma de BVDV es un ARN con polaridad positiva, no segmentado y de hebra sencilla, que posee una longitud de 12.5 kb (Donis, 1995; Hamers et al., 2001; Létora, 2003). El virión cuenta con una estructura icosaédrica con un diámetro entre 40 a 60 nm. Está constituido por una cápside icosaédrica, rodeado de una envoltura lipoprotéica (Donis, 1995) y su genoma posee un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos (Hellen et al., 2007).

2.2.1. Replicación Viral El virus presenta afinidad por los linfocitos, las células mononucleares y las epiteliales (Jaime, 1996) y se ha observado que los biotipos no citopáticos prefieren leucocitos, órganos linfoides y células del tracto respiratorio mientras que los biotipos citopáticos se restringen más al tracto digestivo (Hamers et al., 2001), esto significa que existen diferencias en el tropismo dependiendo del biotipo.

En el proceso de adhesión y penetración de virus a la célula están involucradas las proteínas de la envoltura viral Erns, E1 y E2 (Lazar et al., 2003). Si bien poco se conoce de los pasos iniciales del ciclo de infección de BVDV, se ha mostrado que la adhesión y entrada viral se lleva a cabo en dos pasos (Iqbal et al., 2000): el primero, consiste en la interacción o unión de la Erns con un receptor de la superficie celular dependiente de clatrina (Grummer et al., 2004); y el segundo, la interacción de la E2 con una molécula más específica en la superficie, un coreceptor necesario para mediar la penetración (Hulst et al., 2001; Iqbal et al., 2000).

Luego de adherirse y penetrar en la célula huésped, el virus ingresa al citoplasma por un proceso de endocitosis mediado por un pH ácido. Ahí libera su genoma y el ARN viral, que actúa como un ARNm, entra en contacto con los ribosomas en la subunidad 40S mediante un dominio específico en el extremo 5'UTR (IRES) para iniciar la traducción (Hulst et al., 2001). El virus

utiliza el retículo endoplasmático como sitio primario para el ensamblaje de sus proteínas, biogénesis de las glicoproteínas de la envoltura y la formación del virión (ST-Louis, 2005). El ARN viral es traducido a una poliproteína que en su clivaje por enzimas virales y celulares, dará origen a las proteínas estructurales y no estructurales (Agapov et al., 2004). La replicación del genoma viral lo realiza la ARN polimerasa dependiente de ARN viral, produciendo hebras complementaria. Sucesivamente, la polimerasa viral usa estas hebras negativas para sintetizar las nuevas moléculas de ARN positivo que inmediatamente se encapsidarán para formar nuevos viriones (Hamers et al., 2001).

2.2.2. Proteínas virales

2.2.2.1 Proteínas estructurales Este virus cuenta con la proteína C en la cápside y tres proteínas más en la envoltura Erns, E1 y E2. La proteína C empaqueta el ARN viral, la proteína de envoltura Erns es la encargada de la primera interacción con la membrana celular (Hulst et al., 2001) y las glicoproteínas E1 y E2 participan en el proceso de adherencia. Adicionalmente la proteína E2 contiene los epítopes que inducen a la producción de anticuerpos (Donis, 1995; Lazar et al., 2003).

2.2.2.2 Proteínas no estructurales Ocho son las proteínas involucradas con el proceso replicativo del virus. Ellas son la Npro, P7, NS2, NS2-3, NS3, NS4A, NS5A y NS5B (Donis, 1995; Johnson et al., 2001; Mendez et al., 1998). La proteína Npro presenta función proteolítica, la P7 está asociada con la proteína estructural E2 en células infectadas pero no se sabe bien su función y la NS5B presenta actividad ARN polimerasa dependiente de ARN viral (Choi et al., 2006). La

proteína NS2-3 está presente en los dos biotipos CP y NCP y da origen a la proteína NS3 que solo está presente en los biotipos citopáticos (Hamers et al., 2001).

2.2.3 Clasificación

2.2.3.1 Biotipos virales En la naturaleza existen 2 biotipos, el NCP y el CP que se diferencian por su habilidad de causar muerte celular en cultivos celulares (Peterhans et al., 2010). El biotipo CP induce destrucción masiva celular mediante la formación de vacuolas citoplasmáticas con la muerte de las células pocos días después de la infección. El biotipo NCP es más prevalente en la naturaleza y no causa efectos visibles en las células. Se ha establecido que algunos virus como mecanismo de evasión al sistema inmune del organismo “apagan” la apoptosis, una de las respuestas más comunes cuando hay infección viral (Ridpath, 2005).

2.2.3.2 Genotipos virales Con el surgimiento de la secuenciación, el BVDV ha sido dividido en dos genotipos el 1 y el 2, caracterizados por diferencia en secuencia en las regiones 5´UTR y en las regiones codificantes para Npro y E2 (Vilcek et al., 2005), presentando una homología aproximadamente de 60% (Ridpath et al., 2000).

Los dos biotipos se encuentran presentes en los dos genotipos (Bolin et al., 2004). El genotipo 1 (BVDV-1) que causa diarrea, lesiones en las mucosas y fiebre y el genotipo 2 (BVDV-2) que se ha asociado con síndrome hemorrágico caracterizado por leucopenia, diarreas agudas, fiebres altas y muerte en terneros adultos (Brodersen, 2014). Estudios de RT-PCR amplificando diferentes regiones del genoma han determinado al menos veinticinco diferentes subgenotipos de BVDV-1

y BVDV-2 y se ha propuesto que estos se relacionan con regiones geográficas (Yesilbag, et al. 2017).

Recientemente y a partir de suero fetal bovino contaminado, se determinó la presencia de un tercer genotipo BVDV-3 “HoBi-Like” (Ridpath, 2010), del cual se ha demostrado su presencia en diferentes partes del mundo (Bauermann et al., 2015; Bauermann et al., 2016; Decaro et al., 2012, 2013; Haider et al., 2014; Ridpath, 2010).

2.3 La enfermedad

La infección del ganado con BVDV puede resultar en uno de los tres síndromes definidos para la enfermedad: diarrea viral bovina o infección aguda, infección fetal (animales persistentemente infectados PI) y la enfermedad de las mucosas (Potgieter, 1997).

2.3.1. Presentación aguda de la infección por BVDV Es la forma clásica de la enfermedad que se da tanto por biotipos CP como NCP causando problemas a nivel reproductivo, respiratorios y digestivos (Baker, 1995; Baule et al., 2001; Walz et al., 2001). La enfermedad respiratoria puede ser una de las principales manifestaciones en esta forma de infección (Potgieter, 1997).

2.3.2. Infección persistente Los animales persistentemente infectados (PI) son infectados dentro de los 35 y 125 días de la gestación. La generación de la persistencia es debido a la exposición al virus cuando el sistema inmune del feto está desarrollándose (40-125 días). Esta condición está asociada con la infección con el biotipo NCP y estos animales se convierten en los mayores diseminadores de la enfermedad (Campbell, 2004). Los animales PI son inmunotolerantes

al BVDV y a los virus homólogos, mientras que pueden ser inmunocompetentes a las cepas heterólogas y también frente a otros antígenos. En estos animales el virus persiste en todos los tejidos, especialmente en las células del sistema inmune (Sandvik, 2005).

2.3.3. Enfermedad de las mucosas Este síndrome se desarrolla a partir de animales persistentemente infectados que son infectados por un virus citopático de un serotipo similar (Baker, 1995). Esta forma de presentación de la enfermedad está caracterizada por úlceras en la cavidad bucal, anorexia, pirexia, alta mortalidad y baja morbilidad (Campbell, 2004).

2.4 Métodos de transmisión y factores de riesgo

La transmisión se puede ocurrir de dos formas: vertical y horizontal. La transmisión vertical ocurre en cualquier etapa de la gestación donde el virus atraviesa la placenta e infecta al feto (Létora, 2003; Rondon, 2006). La forma horizontal se da por el contacto directo del animal sano con las secreciones o excreciones de animales PI o animales con infección aguda (Sandvik, 2005).

Se sabe que la principal fuente de infección son los animales PI, los cuales excretan gran cantidad del virus por semen, moco, saliva y leche (Brock, 2004; Sandvik, 2005). Los animales en pico de viremia también son una fuente considerable de infección, estos excretan el virus desde el cuarto día hasta el décimo después de la infección (Sandvik, 2005).

Las malas prácticas pecuarias constituyen un riesgo importante para la diseminación viral al igual que la compra de novillas preñadas y ternero jóvenes positivos para el virus, la proximidad a un hato contaminado, el tamaño del hato, el compartir pastos con otros propietarios y el

intercambio de animales. Estos son algunos de los factores de riesgo considerados para la diseminación del BVDV (Gates et al., 2014; Kobayashi et al., 2010; Moen et al., 2005).

2.5. Métodos diagnósticos

2.5.1. Detección de antígeno

2.5.1.1. Detección directa de Antígeno Debido al rápido crecimiento del virus en distintas líneas celulares y dada su especificidad, el aislamiento viral se constituye la prueba de oro “gold estándar” para diagnosticar BVDV, sin embargo, es de alto valor económico y para su ejecución se requiere una infraestructura y personal adecuado (Sandvik, 2005).

La detección del antígeno se hace mediante el empleo de anticuerpos marcados y visualizados con inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia (Castañeda, 2004) lo cual es detectable en cultivo de linfocitos, tejidos e improntas (Vargas et al., 2009). También se puede usar la técnica de ELISA usando anticuerpos monoclonales para inmovilizar un antígeno particular como la proteína NS2-3, Erns o E2 (Sandvik, 2005).

2.5.2. Detección de anticuerpos específicos

2.5.2.1. Seroneutralización Esta prueba busca determinar el título de anticuerpos que es capaz de inhibir la infección del virus en cultivo celular. Los anticuerpos detectados están dirigidos contra los epítopes de la proteína E2 (Sandvik, 2005), sin embargo se debe confirmar que el cultivo celular sea negativo previamente para BVDV para evitar falsos positivos (Sandvik, 2005)

2.5.2.2. ELISA indirecta y competitiva Esta prueba permite la detección de anticuerpos séricos contra BVDV en suero y en leche. Se usa frecuentemente dado a que permite muestrear gran número de animales y tiene un bajo costo (Sandvik, 2005).

2.5.3. Detección de genoma Es el método que más ventajas ofrece con respecto a los anteriormente nombrados debido a su sensibilidad, especificidad y a que no presenta interferencias con anticuerpos (Sandvik, 2005). El RT-PCR (Polimerasa en cadena con retrotranscripción) ha tenido amplia distribución como método de diagnóstico y además es el paso anterior y necesario para realizar la genotipificación (Fulton et al., 1999).

2.6. Control y prevención

2.6.1. Control sistemático sin vacunación Se fundamenta tener claros los factores de riesgo y evitar que estos se presenten en el hato. Para su implementación es necesario iniciar con la identificación de los animales PI y su inmediata eliminación, seguido de un monitoreo continuo del hato mediante la realización de pruebas diagnósticas para confirmar la salubridad del hato o detectar nuevos brotes de infección (Houe et al., 2006; Lindberg et al., 1999; Moennig et al., 2005). En este control también se implantan medidas de prevención como el control en el desplazamiento de animales entre fincas, el uso de semen certificado, entre otros. Bajo este esquema se ha erradicado la enfermedad en la región escandinava (Dinamarca, Finlandia, Suecia y Noruega) (Gates et al., 2014).

2.6.2 Control sistemático con vacunación Se basa en la implementación de esquemas de vacunación. Este programa se ha desarrollado en países donde el control mediante el diagnóstico y eliminación de PI no han sido suficientes (Moennig et al., 2005). Entre los protocolos vacunales se ha sugerido una vacunación inicial con una vacuna inactivada y 4 semanas después una revacunación con una vacuna de virus vivo modificado, con el fin de generar una eficiente inmunidad humoral y celular, lo que genera una buena protección al feto (Moennig et al., 2005).

Entre las vacunas disponibles a nivel mundial se encuentran las vacunas inactivadas y las de virus vivo modificado (VLM), que son en su mayoría son polivalentes y que se administran junto con otros antígenos virales como Parainfluenza Bovina, Rinotraqueitis Bovina Infecciosa y algunos antígenos bacterianos (Newcomer et al., 2017; Nobiron et al., 2003).

2.6.2.1. Vacunas Inactivadas En estas vacunas el virus pierde su capacidad infectiva y replicativa mediante el uso de químicos como la Beta propiolactona, Etilamina Binaria (BEI), entre otros (Newcomer et al., 2017). Son vacunas muy seguras y se pueden administrar en cualquier momento de la gestación, sin embargo requiere una revacunación cada 6 meses para mantener altos niveles de anticuerpos vacunales (Makoschey et al., 2001).

2.6.2.2. Vacunas virus vivo modificado (VLM) Estas vacunas contienen cepas atenuadas del BVDV pueden ser capaces de replicarse. El proceso de atenuación se lleva a cabo mediante pasajes consecutivos en cultivos celulares entre otros (Vargas et al., 2009) y como desventaja importante de su uso está la capacidad del virus de atravesar la barrera placentaria e infectar el feto, así como la generación de inmunosupresión, predisponiendo al animal a infecciones con otros patógenos (Houe et al., 2006).

3. Materiales y Métodos

Este estudio hace parte del macroproyecto realizado por el grupo de virología de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ) y la empresa Vecol, titulado “Proyecto piloto de excelencia sanitaria” en el cual se están estudiando las prevalencias y los factores de riesgo de los 10 patógenos de mayor impacto epidemiológico que afectan el ganado bovino en el país. En este proyecto se recogieron sueros de vacas localizadas en siete departamentos de Colombia. A estos sueros se les determinó la seroprevalencia de los 10 patógenos dentro de los cuales está el BVDV, quien mostró niveles de seroprevalencia de 32% para animales y 90% para predios. Basado en este resultado y teniendo en cuenta que los animales PIs se caracterizan por ser seronegativos, se procedió a realizar este trabajo.

3.1. Cálculo y recolección de muestras

Las muestras seleccionadas para este estudio fueron las correspondientes a los animales cuya prueba de ELISA se encontró negativa.

Empleando la plataforma WinEpiscope (Blas et al., 1996) según la fórmula de muestreo para estimar una proporción, el número de animales necesarios teniendo en cuenta una prevalencia promedio del 5% de PI (Huaman, 2007; Kameyama, 2016), una población de 22.574.780 cabezas de ganado bovino (censo bovino nacional del año 2014), un nivel de confianza de 99% y un error aceptado del 3.5%. El número de muestras fue 260 animales y el muestreo se realizó en 5 de los

departamentos de Colombia de producción de leche, carne y doble propósito: Caquetá, Antioquia, Cauca, Huila y Sucre (Anexo 7). La muestra de preferencia para determinar la presencia viral, que es la misma muestra tomada para este estudio, fue una muestra de cartílago de la parte superior de la oreja. Esta biopsia fue extraída por los veterinarios de Vecol utilizando el protocolo anexo. (Anexo 1. Protocolo de toma de muestra).

3.2. Extracción de ARN

A partir del tejido de cartílago de oreja de las vacas seronegativas, se extrajo el ARN y se usó el estuche comercial RNeasy Mini Kit de QIAGEN® siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3. puesta A punto de técnica de RT-PCR para la detección de BVDV

Los primers empleados en este estudio fueron los reportados por Vilcek y colaboradores en 1994 (Vilcek et al., 1994) ver tabla 1, que amplifican una región de 288 pb sobre la región no codificante 5UTR y la región codificante para la proteína Npro del ORF. Con el fin de verificar su especificidad se realizó un análisis bioinformático (Anexo2) y con el objeto de optimizar las condiciones de amplificación reportadas, se realizó un gradiente de temperatura (48°C hasta 56°C con intervalos de 3.3 °C) usando como control positivo ARN previamente identificado como positivo para BVDV, gentilmente donado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y como control negativo agua bidestilada y desionizada.

Tabla 1.

Primers empleados para la amplificación y secuenciación de un fragmento del genoma ubicado en la región 5'UTR y el inicio de la secuencia codificante para la proteína Npro.

Región	Secuencia de primer 5`- 3`	Producto obtenido (pb)	TM °C	GC%	Referencia
5`UTR y Npro	F: CATGCCCATAGTAGGAC	288	49	52.9	(Vilcek et al., 1994)
	R: CCATGTGCCATGTACAG		50.5	52.9	

3.4. Ensayo de sensibilidad de la PCR

Con el fin de determinar la sensibilidad de la PCR, se clonó el producto de PCR en el vector pELMO (Ramos et al., 2017). El fragmento de ADN de 5UTR y Npro (para un total de 288 pb), se amplificaron. Tal amplificación se realizó usando un PCR master mix de Roche ®, empleando los primers descritos en la tabla 1. Se utilizó un kit de preparación de PCR Wizard (Promega®) para purificar los amplicones génicos obtenidos a partir de la PCR. Cada producto de PCR purificado se ligó en un nuevo vector (pELMO) (Ramos et al., 2017). Las reacciones se incubaron durante 12 horas a 16 ° C con T4 ADN ligasa (Promega®), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La posterior transformación de E. coli TOP10 se realizó con 100 µL E. coli TOP10 células químicamente competentes (Invitrogen®), que proveen las condiciones necesarias para la clonación del plásmido y la selección posterior se lleva a cabo con ampicilina. Las células fueron incubadas con 5 µL del producto de ligación durante 20 min en hielo, sometidas a calor a 42°C durante 30seg y crecidas en medio SOC a 37 ° C, con agitación durante 1 hora. Las células transformadas se sembraron en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contenían 100 µg / ml de ampicilina. Las colonias se contaron y se analizaron mediante PCR de colonias después de 16 horas. Esta es una PCR que se inicia directamente desde la colonia y se le coloca la mezcla que

contiene los primers del inserto. Esto se realiza para verificar que la colonia recombinante tenga efectivamente el inserto que incluye los productos que se confirmaron luego mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los clones recombinantes se cultivaron para purificar el plásmido usando un kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (ZYMO RESEARCH®). El ADN plasmídico extraído se confirmó por secuenciación y se usó como plantilla de amplificación en ensayos de sensibilidad de la PCR. Se procedió a realizar diluciones seriadas del vector con una concentración inicial de 126,8 ng/ul hasta llegar a la dilución 1/10000. Posteriormente se realizó una PCR a cada dilución a fin de encontrar la máxima dilución que lograría ser amplificada.

3.5. RT-PCR detección de BVDV

La detección de BVDV se evaluó con la RT-PCR donde el primer paso fue la retro-transcripción del RNA viral a cDNA empleando Random primers, MLV- RT, dNTPS y RNA out de Invitrogen®. El perfil térmico estandarizado fue: 70°C por 3 minutos, 42°C por 30 minutos y 94°C por 5 minutos. Seguido de una PCR dirigida a amplificar un segmento de la región no codificante 5'UTR y el segmento codificante para la proteína Npro empleando los primers previamente reportados para un total de 288pb (Vilcek et al., 1994). Se emplearon dNTPS y Taq Platinum de Invitrogen®. El perfil térmico estandarizado de 35 ciclos de 95°C por 5 minutos, 94°C por 45 segundos en la fase de desnaturalización y 54°C por 1 minuto en la fase de hibridación, para la elongación 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos. Como control positivo se empleó ARN previamente identificado como positivo para BVDV. Las concentraciones de los reactivos por cada reacción se pueden observar en el anexo 3.

La visualización de los resultados obtenidos en la RT-PCR (región 5'UTR y Npro), se realizó en geles de agarosa al 1.5% preparados en TAE 1X (Biorad®) con el intercalante fluorescente HydraGreen (ACTGene®), se utilizó el marcador de peso HyperLadder 100 bp de Bioline® para comparar los fragmentos obtenidos. Los corridos electroforéticos se realizaron a un voltaje constante de 120V por 60- 70 min.

3.6. Genotipificación y secuenciación

Con el fin de obtener la concentración y calidad suficiente del producto a secuenciar, a partir del cDNA de las muestras positivas se realizó una PCR adicional empleando las condiciones descritas en el numeral 5 de la metodología.

Se realizó un corrido electroforético sembrando todo el producto obtenido de la PCR para la posterior purificación a partir del gel de agarosa utilizando el estuche comercial High Pure PCR Product Purification Kit for de ROCHE® siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se corrió de nuevo un gel de electroforesis sembrando 1 ul por cada producto con el fin de verificar concentración y pureza (50ng/ul). Aquellos fragmentos que cumplían las condiciones de cantidad y pureza fueron enviados a Macrogen Korea para su secuenciación por el método de Sanger.

3.6.1. Análisis de secuencias Por cada producto de amplificación, correspondiente a cada animal, se secuenciaron dos hebras (Forward y Reverse), las cuales fueron editadas empleando el paquete Staden (Bonfield et al., 2010) obteniendo la secuencia consenso para cada muestra.

Posteriormente se realizó de manera manual y automática un alineamiento múltiple combinado de todas las secuencias con la ayuda del software Mega 7 (Kumar et al., 2016).

Se realizó una búsqueda de genomas completos reportados hasta la fecha para BVDV, provenientes de diferentes partes del mundo para realizar las comparaciones filogenéticas en la base de datos del NCBI (Anexo 4).

Para la construcción del data set, se emplearon las secuencias de genoma completo reportadas en el Genbank (Anexo 4) y de los aislados colombianos realizados en este estudio, las cuales ya fueron sometidas al Genbank (Anexo 5), para un total de 26 secuencias, cada una de ellas con 288pb pares de bases

Se seleccionó el modelo evolutivo que mejor se ajusta a este data set, con la herramienta provista por el software Mega7 (Kumar et al., 2016), resultando General Time Reversible (GTR) y distribución de tipo Gamma (G) (Anexo 6) como la mejor elección. Este modelo se escogió con base al criterio informativo de Akaike (AIC).

Para construir el árbol filogenético se trabajó con el método de inferencia de máxima verosimilitud teniendo en consideración los gaps, utilizándose como medida de robustez para cada nodo el método bootstrap (100 pseudo-replicas) y empleando Mega7 (Kumar et al., 2016). Una vez obtenidos los arboles filogenéticos se procedió a su edición utilizando el software FigTree v1.4.1 (Rambaut, 2009).

Adicionalmente con el objetivo de dar mayor robustez al estudio filogenético, se realizó la construcción del árbol filogenético con el programa MrBayer (Huelsenbeck, 2015), se realizó inferencia filogenética en un marco bayesiano (IB) utilizando el modelo evolutivo de GTR+G, con 100000 generaciones, muestreando cada 10000, tres cadenas de Markov Montecarlo bajo el

algoritmo de Metropolis-Hastings (MCMC) y burn-in de 25%. La convergencia de los análisis realizados se comprobó usando el software Tracer v1.6 (Rambaut, 2014).

4. Resultados

4.1 Puesta a punto de técnica de RT-PCR para la detección de BVDV

La RT-PCR estandarizada se puede observar en la figura 1 donde la banda amplificada es el control positivo del tamaño esperado de 288pb.

ENSAYO DE SENSIBILIDAD DE LA PCR

Con el fin de determinar la sensibilidad de la PCR se realizaron diluciones seriadas en base diez a partir del plásmido puro con una concentración de 126.8 ng/ul, Se realizó la PCR para cada dilución. Se obtuvo como resultado la amplificación hasta la dilución $1/10^4$ la cual correspondía a una concentración de 12,68 pg/ul (Figura 1).

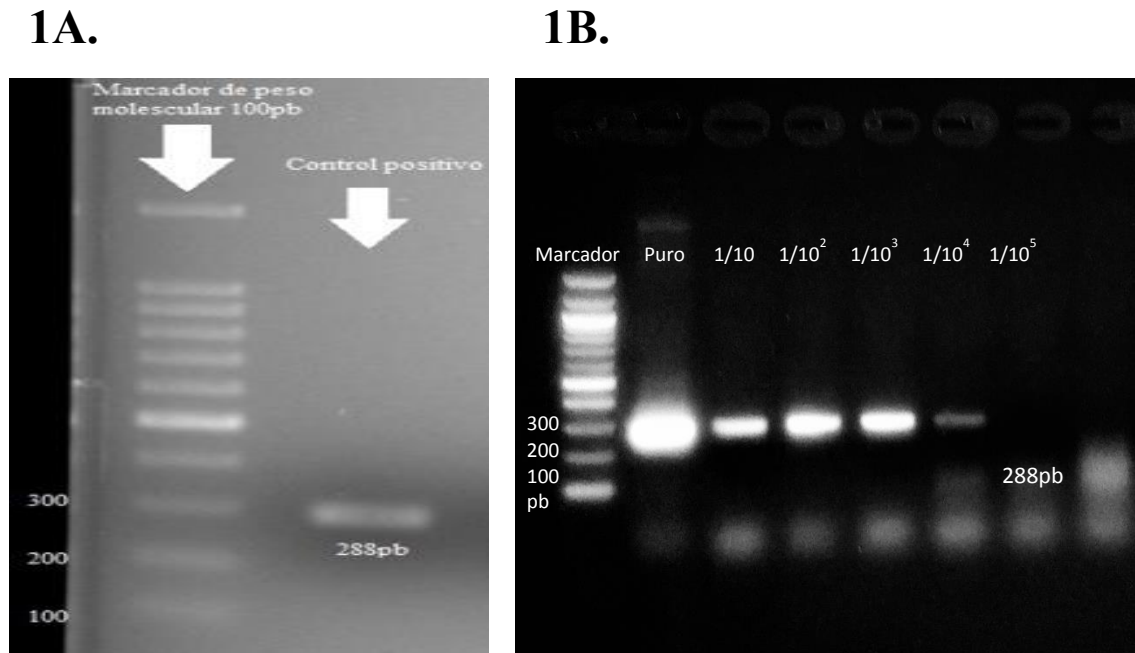


Figura 1 **A.** Gel representativo de estandarización de la RT-PCR para detección de un fragmento del genoma ubicado en la región 5'UTR y el inicio de la secuencia codificante para la proteína Npro. **B.** Prueba de sensibilidad de la RT-PCR para detección de fragmento del genoma ubicado en la región 5'UTR y el inicio de la secuencia codificante para la proteína Npro. Pozo 1, marcador de peso molecular de 100pb, pozo 2 plásmido puro, pozos del 3 al 7 diluciones seriadas del plásmido (1/10, 1/100, 1/1000, 1/100000). Se observa que la mínima concentración detectada que se logra amplificar con la PCR descrita es de 12,68 pg/ul, correspondiente a la dilución 1/10⁴.

PREVALENCIA DE ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI)

En este trabajo, un total de 260 muestras de cartílago de oreja fueron evaluadas por ensayo de RT-PCR. De estas, 19 (7%) muestras dieron positivo para la región no codificante 5'UTR y la región codificante para la proteína Npro de BVDV, donde 10% (4/40), 13% (7/53), 9% (4/47), 10% (3/30) y 1% (1/90) fueron provenientes de los departamentos de Caquetá, Antioquia, Cauca, Huila y Sucre, respectivamente. La figura 2 muestra la ubicación y los porcentajes de prevalencia de animales PI en los diferentes departamentos de Colombia.

A nivel de predios, se analizaron un total de 45. De estos 10 (22%) fueron positivos para PI de BVDV, lo que implica que al menos un animal fue positivo por predio. Por departamento encontramos 3 de 5 predios (60%) en Caquetá, 1 de 3 predios (33%) en Antioquia, 4 de 20 predios (20%) en Cauca 1 de 3 predios (33%) en Huila y 1 de 14 predios (7%) en Sucre fueron positivos.

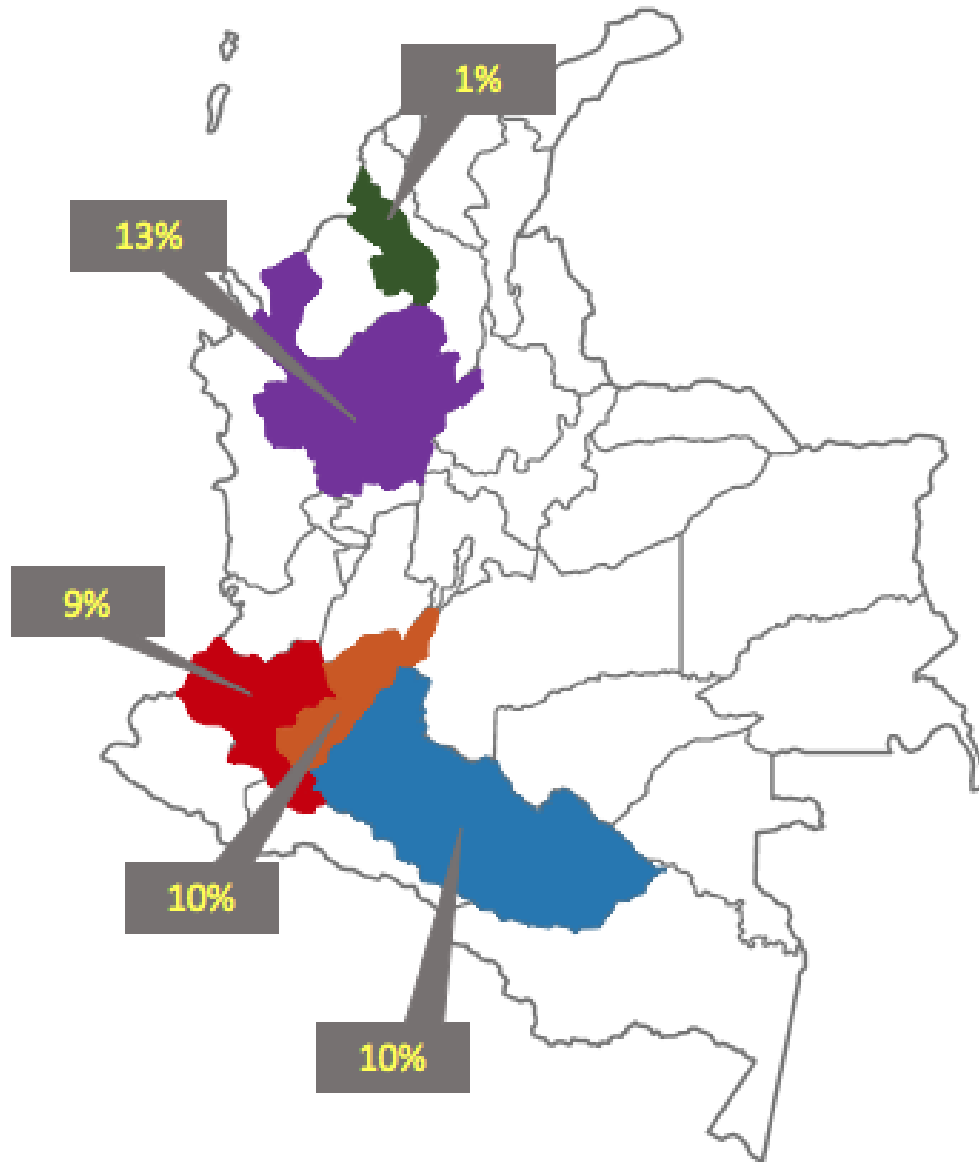


Figura 2. Positividad por departamento para el BVDV de animales PI. Sucre (Verde) 1%, Antioquia (Morado) 13%, Cauca (Rojo) 9%, Huila (Naranja) 10% y Caquetá (Azul) 10%, Para un total de 7% de prevalencia de PI de BVDV en Colombia.

GENOTIPIFICACIÓN

De las 19 muestras que dieron positivo para la región no codificante 5'UTR y la región codificante para la proteína Npro de BVDV solo 11 muestras cumplieron con la concentración requerida por MacroGen Korea de contener al menos 50ng/ul lo cual se vio reflejado en la visualización de la banda en el corrido electroforético.

Todas las muestras evaluadas por el método de máxima verosimilitud empleando el software MEGA 7 se agruparon con las secuencias previamente reportadas en estudios anteriores pertenecientes al genotipo 1 como se puede observar en la figura 3A.

Los resultados del análisis por el enfoque bayesiano mostraron un comportamiento similar al realizado por el método de ML (Figura 3B). Agrupando las secuencias obtenidas en este estudio con las reportadas pertenecientes al genotipo 1.

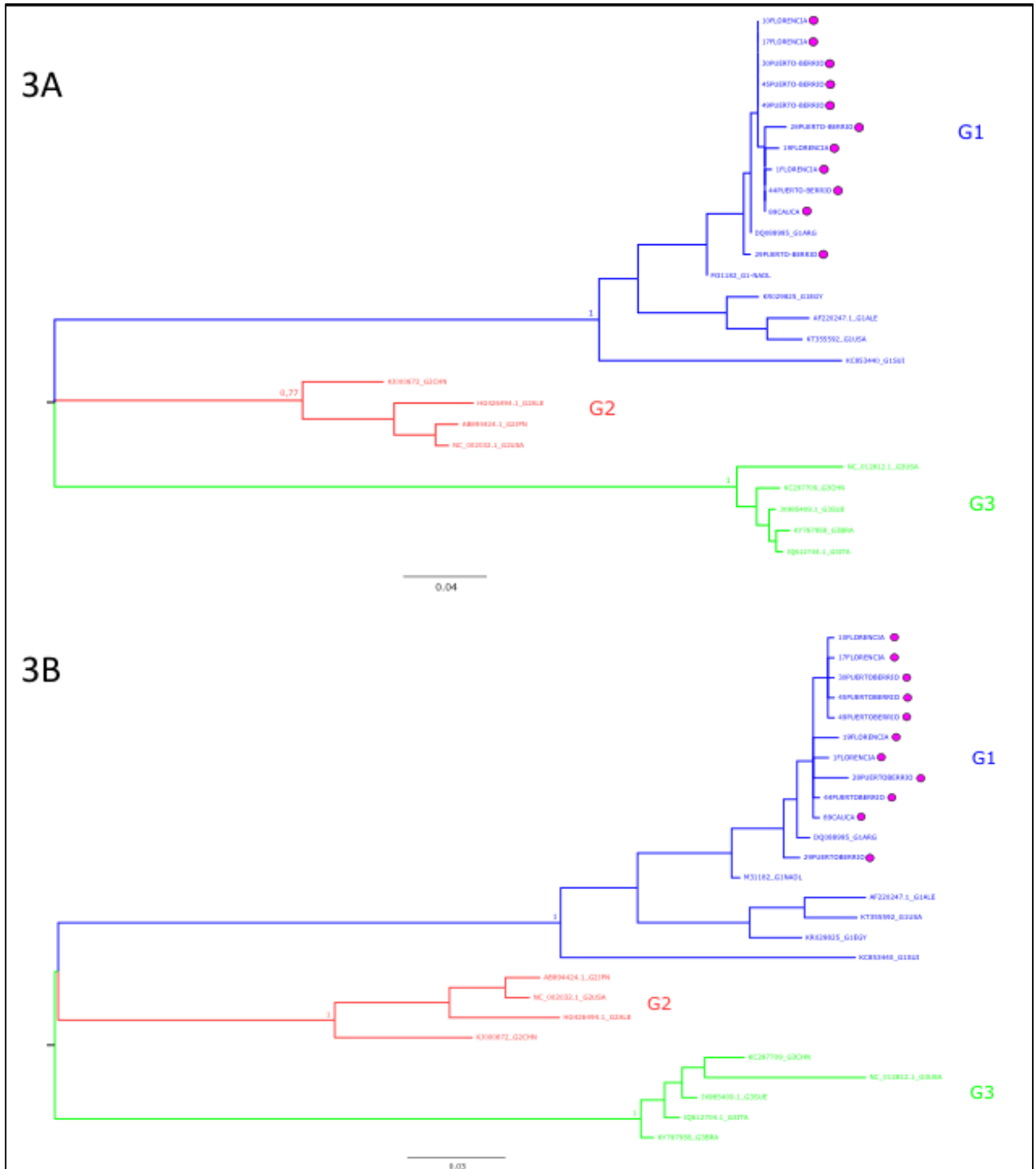


Figura 3. Reconstrucción Filogenética 5'UTR y Npro de BVDV en PI.

A. Análisis filogenético molecular por método de máxima verosimilitud. La historia evolutiva

se dedujo utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Tiempo General

Reversible. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-1505.75). El porcentaje de árboles en el que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque Maximum Composite Likelihood (MCL) y luego seleccionando la topología con un valor de verosimilitud log superior. Se utilizó una distribución discreta de Gamma para modelar las diferencias de velocidad evolutivas entre los sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0,3343)). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 26 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 325 posiciones en el conjunto de datos final. Se realizaron análisis evolutivos en MEGA7. Las secuencias colombianas se agrupan en el genotipo 1 (Azul) señaladas con un círculo fucsia, con un bootstrap de 1. **B. Análisis filogenético por método de inferencia bayesiana.** La historia evolutiva se dedujo utilizando el método inferencia bayesiana basado en el modelo de Tiempo General Reversible. Se utilizó una distribución discreta de Gamma para modelar las diferencias de velocidad evolutivas entre los sitios. Frecuencia de muestreo 100000 de generaciones, frecuencia de muestreo de 10000, tres cadenas de Markov Montecarlo bajo el algoritmo de Metropolis-Hastings (MCMC). Las secuencias colombianas se agrupan en el genotipo 1 (Azul) señaladas con un círculo fucsia en donde el nodo muestra una probabilidad posteriori de 1. El análisis se realizó en el software MrBayes.

5. Discusión

La diarrea viral bovina es una de las 10 infecciones de mayor impacto en el ganado bovino (Houe, 2003). Si bien existen vacunas que han tratado de disminuir su presencia (Newcomer et al., 2017; Houe et al, 2007), estas no han sido muy efectivas dando como resultado altas tasas de seroprevalencia de BVDV en el mundo (Ridpath, 2010). Establecer los factores de riesgo asociados a la presentación de BVDV, es importante conocerlos para así disminuirlos y aumentar la bioseguridad del hato (Kobayashi, 2010), sin embargo, esta estrategia aparentemente no es suficientemente efectiva debido a que no evita la diseminación viral generada por los animales PIs, dado a que estos excretan grandes cantidades de virus durante su vida y son la principal fuente de transmisión del virus a los animales susceptibles. Por lo tanto, la identificación y eliminación de animales PIs, junto con la implementación de medidas de bioseguridad, son cruciales para el control y la prevención de la enfermedad (Yesilbag, et al., 2017), prueba de ello son los países escandinavos que han logrado erradicar la circulación de BVDV implementando tres aspectos como son la identificación de animales PI, eliminación de estos y monitoreo constante de la población (Gunn. et al, 2005) En Colombia, se hace imprescindible la identificación de los animales PIs para poder adoptar medidas adecuadas que contrarresten la infección por BVDV.

La identificación y diagnóstico de los animales PIs se realiza por aislamiento viral o por RT-PCR (Sandvik, 2005), dadas las complicaciones estructurales y logísticas que implica hacer el aislamiento, las pruebas de biología molecular resultan ser más viables, y por esta última metodología se ha buscado el virus en muestras de suero pero estas son poco sensibles (Ridpath,

2010) , de manera que el cartílago de la oreja es la muestra de elección por encontrarse el virus activo y en mayor cantidad (Houe et al., , 2006; Lindberg et al., 1999; Moennig et al., 2005).

En este estudio, se identificaron los animales PIs por la presencia de antígeno en el cartílago de su oreja, por medio de la técnica de RT-PCR altamente sensible (Figura 1B), sin embargo esta estrategia no se realiza de manera rutinaria para el control de la sanidad animal en nuestro país.

La prevalencia de 7% de animales PIs (Figura 2) y 22% en predios es una cifra muy alta teniendo en cuenta que en el mundo se reportan la presencia de PIs hasta en el 2% de los animales (Houe, 1999). Por ejemplo, en el noreste de Brasil, demostraron valores del 0.09% hasta 0.13% (Silveira et al., 2017), en Uruguay se tienen reportes de 4.1% (Maya et al., 2015) en Bélgica se reportó un prevalencia 0,32% de animales PI (Hanon et al., 2014). Para el caso de predios se tienen reportes en Perú de hatos productores de leche con 4% de positividad (Huaman, 2007) y en Japón el 7,6 % de predios positivos (Kameyama, 2016). Valores que también son muy bajos en comparación al 22% de positividad en predios reportados en este estudio. Esta prevalencia de PIs y el alto nivel de predios positivos reportado en este estudio debe alertar a las autoridades sanitarias, para evitar la diseminación viral que impacta directamente la productividad del animal, manifestada por el bajo peso, la poca producción lechera, los abortos frecuentes, problemas respiratorios y digestivos (Houe, 2003; Castañeda, 2004).

Respecto a la genotipificación, hasta la fecha se han descrito al menos veinticinco diferentes subgenotipos de BVDV-1, BVDV-2 y BVDV-3 se ha propuesto que estos se relacionan con regiones geográficas (Yesilbag, et al. 2017). En este estudio se realizó una RT-PCR seguido de secuenciación de la región no codificante 5`UTR y la región codificante para la proteína Npro con el fin determinar el genotipo circulante, resultando el 1, el más frecuente alrededor del mundo (Brodersen et al., 2014). Estos resultados contrastan a lo encontrado en reportes previos de Brasil

(Silveira et al., 2017), Italia (Giammarioli et al., 2015), India (Mirsha et al., 2014) y Bangladesh (Haider et al., 2014) en donde se obtuvo a BVDV-2 o BVDV-3 como los únicos encontrados, sin embargo, es similar a lo reportado por otros autores como Maya en Uruguay en el 2015, Pecora en Argentina, Pizarro en Chile, Weber en Brasil y Ridpath y Fullton en Australia quienes reportaron al genotipo 1 como prevalente en sus respectivos países (Maya et al., 2015; Pecora et al., 2014; Pizarro et al., 2006; Weber et al., 2014; Ridpath. et al, 2010). No obstante, la circulación de genotipos también ha sido reportada. Un ejemplo es Norteamérica donde el análisis filogenético de 5'UTR para 119 cepas de BVDV reveló la presencia del genotipo 1 y genotipo 2 (Workman et al., 2016). Para el caso de Europa, en Italia el análisis filogenético de 173 muestras recolectadas durante los años 1997 al 2014, demostró la circulación de diez de los subtipos de BVDV-1 (Giammarioli et al., 2014). En Alemania se analizaron 61 aislamientos del virus recolectados entre los años 1960 y 2000, donde el análisis filogenético permitió la discriminación de los genotipos BVDV 1 y 2 (Tajima et al., 2001), y en Japón de 62 aislados se obtuvo la presencia del genotipo 1 y 2 (Nagai et al., 2001).

Es la primera vez que se reporta el genotipo circulante de BVDV en Colombia, lo cual no solo es importante como dato epidemiológico, sino además obliga a las autoridades sanitarias a tener más control de la movilidad de animales que ingresan al país y que puedan tener otros genotipos y formar parte del problema.

Por otro lado, los genotipos 1 incluyen los aislados clásicos, que se usan comúnmente en cepas de referencia y producción de vacunas, dato es importante para los productores y comercializadores de vacunas en Colombia, teniendo en cuenta las estrategias no clásicas para producción de vacunas tales como las reversas (Rappuoli. et al, 2016), estrategias que sin duda deberían ser implementadas para vacunas de uso animal. Por su parte, el genotipo 2 incluye cepas

de BVDV que pueden estar asociadas con infecciones agudas y de alta mortalidad, trombocitopenia y hemorragia (Khodakaram-Tafti, et al., 2017).

6. Conclusión

La prevalencia de los PI en el caso de la BVDV del 7% con el genotipo 1 como único genotipo circulante en la población bovina colombiana de los departamentos más importantes en la industria ganadera es una prueba de la necesidad de convertir a este patógeno y a esta patología en de reporte obligatorio y pasar a sacrificar los animales portadores del virus.

Los datos genotípicos y epidemiológicos aquí aportados son útiles para la toma de decisiones gubernamentales dada la alta prevalencia y para la elaboración de vacunas más eficientes para las variantes virales circulantes de BVDV en Colombia.

Referencias Bibliográficas

- Agapov, E. V, Murray, C. L., Frolov, I., Qu, L., Myers, T. M., & Rice, C. M. (2004). Uncleaved NS2-3 Is Required for Production of Infectious Bovine Viral Diarrhea Virus, 78(5), 2414–2425. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.5.2414>
- Baker, J. C. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 11(3), 425–45. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30460-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30460-6)
- Bauermann, F. V., & Ridpath, J. F. (2015). HoBi-like viruses – the typical “atypical bovine pestivirus.” *Animal Health Research Reviews*, 16(1), 64–69. <https://doi.org/10.1017/S146625231500002X>
- Bauermann, F. V, Falkenberg, S. M., & Ridpath, J. F. (2016). HoBi-Like Virus RNA Detected in Foetuses Following Challenge of Pregnant Cows that had Previously Given Birth to Calves Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus, 1–9. <https://doi.org/10.1111/tbed.12556>
- Baule, C., Kulcsár, G., Belák, K., Albert, M., Mittelholzer, C., Kucsera, L., & Belák, S. (2001). Pathogenesis of Primary Respiratory Disease Induced by Isolates from a New Genetic Cluster of Bovine Viral Diarrhea Virus Type I Pathogenesis of Primary Respiratory Disease Induced by Isolates from a New Genetic Cluster of Bovine Viral Diarrhea Virus Type, 39(1), 146–153. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.146>
- Benfelt S, Grummer B, Wilke G. No caspase activation but overexpression of Bcl-2 in bovine cells infected with non-cytopathic Bovine Virus Diarrhea Virus. *Vet Microbiology* 2003; 96: 313-326
- Blas N, Ortega C, Frankena K, Noordhuizen J: Win Episcopa 1.0a. Veterinary Faculty, Zaragoza and Agricultural University, Wageningen, 1996.
- Bolin, S. R., & Grooms, D. L. (2004). Origin and consequences of bovine viral diarrhoea virus

- diversity. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 20(1), 51–68. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.009>
- Bonfield, James K. and Whitwham, Andrew. *Gap5 - editing the billion fragment sequence assembly*. *Bioinformatics* 26, 1699-1703, (2010)
- Borda A. Diarrea viral bovina en terneros y terneras procedentes de Holanda. Tesis de pregrado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, 1975.
- Brock, K. V. (2004). The many faces of bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 20(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.12.002>
- Brodersen, B. (2014). Bovine Viral Diarrhea Virus Infections : <https://doi.org/10.1177/0300985813520250>
- Campbell, J. R. (2004). Effect of bovine viral diarrhea virus in the feedlot. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 20(1), 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.003>
- Castañeda V. Implementación de la técnica de inmunohistoquímica para la detección del VDVB utilizando Acs monoclonales 15c5 en tejidos fijados con formol. Tesis de pregrado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia 2004.
- Choi, K. H., Gallei, A., Becher, P., Rossmann, M. G., Street, W. S., & Lafayette, W. (2006). The Structure of Bovine Viral Diarrhea Virus RNA-Dependent RNA Polymerase and Its Amino-Terminal Domain, 6(July), 1107–1113. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.05.020>
- Decaro, N., Losurdo, M., Lucente, M. S., Sciarretta, R., Mari, V., Larocca, V., ... Buonavoglia, C. (2013). Persistent infection caused by hobi-like pestivirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4), 1241–1243. <https://doi.org/10.1128/JCM.03134-12>
- Decaro, N., Mari, V., Pinto, P., Stella Lucente, M., Sciarretta, R., Cirone, F., ... Buonavoglia, C. (2012). Hobi-like pestivirus: Both biotypes isolated from a diseased animal. *Journal of General Virology*, 93(PART 9), 1976–1983. <https://doi.org/10.1099/vir.0.044552-0>
- Donis, R. O. (1995). *Molecular-Biology of Bovine Viral Diarrhea Virus and Its Interactions with*

the Host. Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice (Vol. 11). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30459-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30459-X)

- Fulton, R. W., Offay, J. M., Saliki, J. T., Burge, L. J., Helman, R. G., Confer, A. W., ... Ridpath, J. F. (1999). Nested Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Typing Ruminant Pestiviruses : Bovine Viral Diarrhea Viruses and Border Disease Virus, (2), 276–281.
- Gates, M. C., Humphry, R. W., Gunn, G. J., Woolhouse, M. E. J., Bennett, R., Christiansen, K., ... Brownlie, J. (2014). Not all cows are epidemiologically equal: quantifying the risks of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) transmission through cattle movements. *Veterinary Research*, 45(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0110-y>
- Giammarioli, M., Ceglie, L., Rossi, E., Bazzucchi, M., Casciari, C., Petrini, S., & De Mia, G. M. (2014). Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. *Virus Genes*, 50(1), 147–151. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1132-2>
- Giammarioli, M., Ridpath, J. F., Rossi, E., Bazzucchi, M., Casciari, C., & De Mia, G. M. (2015). Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals*, 43(4), 220–224. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.05.009>
- Gunn, G. J. (2005). Assessing economic and social pressure for the control of bovine viral diarrhoea virus, 72, 149–162. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.012>
- Grummer, B., Grotha, S., & Greiser-Wilke, I. (2004). Bovine Viral Diarrhoea Virus is Internalized by Clathrin-dependent Receptor-mediated Endocytosis. *Zoonoses and Public Health*, 51(10), 427-432.
- Haider, N., Rahman, M. S., Khan, S. U., Mikolon, A., Gurley, E. S., Osmani, M. G., ... Rahman, M. Z. (2014). Identification and epidemiology of a rare hobi-like pestivirus strain in Bangladesh. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(3), 193–198. <https://doi.org/10.1111/tbed.12218>
- Hamers, C., Dehan, P., Couvreur, B., Letellier, C., Kerkhofs, P., & Pastoret, P. P. (2001). Diversity among Bovine Pestiviruses. *Veterinary Journal*, 161(2), 112–122. <https://doi.org/10.1053/tvj.2000.0504>

- Hanon, J., Stede, Y. Van Der, Antonissen, A., Mullender, C., Tignon, M., & Berg, T. Van Den. (2012). Distinction Between Persistent and Transient Infection in a Bovine Viral Diarrhoea (BVD) Control Programme : Appropriate Interpretation of Real-Time RT-PCR and Antigen-ELISA Test Results. <https://doi.org/10.1111/tbed.12011>
- Hellen, C. U. T., & de Breyne, S. (2007). A distinct group of hepacivirus/pestivirus-like internal ribosomal entry sites in members of diverse picornavirus genera: evidence for modular exchange of functional noncoding RNA elements by recombination. *Journal of Virology*, *81*(11), 5850–5863. <https://doi.org/10.1128/JVI.02403-06>
- Houe, H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*, *31*(2), 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 diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe, *436*, 427–436.
- Huaman, J. C. (2007). Diarrea viral bovina y animales portadores del virus en hatos productores de leche de la irrigación de Majes , Arequipa.
- Huelsenbeck and Ronquist .MrBayes3.2.6 “Bayesian Infence of PhylogeneticTs.” Bioinformatics Applications Note. Vol 17 No8 Pages 754-755. Oxford University Press (2015)
- Hulst, M. M., Van Gennip, H. G. P., Vlot, A. C., Schooten, E., De Smit, A. J., & Moormann, R. J. M. (2001). Interaction of Classical Swine Fever Virus with Membrane-Associated Heparan Sulfate: Role for Virus Replication In Vivo and Virulence. *Journal of Virology*, *75*(20), 9585–9595. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.20.9585–9595.2001>
- ICTV. (2014). ICTV Virus Taxonomy 2014.
- Iqbal, M., Flick Smith, H., & McCauley, J. W. (2000). Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E-rns with cell surface glycosaminoglycans. *Journal of General Virology*, *81*(2), 451–459.
- Jaime J. Infección persistente con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en hatos lecheros de la Sabana de Bogotá. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia 1996.

- Johnson, C. M., Perez, D. R., French, R., Merrick, W. C., & Donis, R. O. (2001). The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the alpha subunit of translation elongation factor-1. *Journal of General Virology*, 82(12), 2935–2943.
- Kameyama, K. (2016). Survey for detecting persistently infected cattle with bovine viral diarrhea in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*.
- Khodakaram-Tafti, A., & Farjanikish, G. H. (2017). Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iranian journal of veterinary research*, 18(3), 154.
- Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Hayama, Y., Kameyama, K., Konishi, M., & Murakami, K. (2010). Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC Veterinary Research*, 6, 1. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-1>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lazar, C., Zitzmann, N., Dwek, R. A., & Branza-Nichita, N. (2003). The pestivirus Erns glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology*, 314(2), 696–705. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00510-5](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00510-5)
- Létora, W. J. (2003). Diarrea viral bovina : actualización. *Rev Vet*, 14(1), 42–53.
- Lindberg, A. L. ., & Alenius, S. (1999). Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology*, 64(2), 197–222. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00270-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00270-3)
- Liu, L., Xia, H., Baule, C., & Belák, S. (2009). Maximum likelihood and Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic characterization of a novel pestivirus, SVA/cont-08. *Archives of Virology*, 154(7), 1111–1116. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0419-4>
- Makoschey, B., Janssen, M. G. J., Vrijenhoek, M. P., Korsten, J. H. M., & Marel, P. (2001). An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2, 19, 3261–3268.

- Maya, L. (2015). Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2688-4>
- Mendez, E., Ruggli, N., Collett, M. S., & Rice, C. M. (1998). Infectious Bovine Viral Diarrhoea Virus (Strain NADL) RNA from Stable cDNA Clones: a Cellular Insert Determines NS3 Production and Viral Cytopathogenicity. *J. Virol.*, 72(6), 4737–4745. Retrieved from <http://jvi.asm.org/content/72/6/4737.short>
- Mishra, N., Rajukumar, K., Pateriya, A., Kumar, M., Dubey, P., Behera, S. P., ... Reddy, N. D. (2014). Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Veterinary Microbiology*, 174(1–2), 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.09.017>
- Moen, A., Sol, J., & Sampimon, O. (2005). Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals. *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1–2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.014>
- Moennig, V., Eicken, K., & Flebbe, U. (2005). Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Preventive Veterinary Medicine*, 72, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.011>
- Nagai, M., Ito, T., Sugita, S., Genno, A., Takeuchi, K., Ozawa, T., & Sakoda, Y. (2001). Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan *, 685–696.
- Newcomer, B. W., Chamorro, M. F., & Walz, P. H. (2017). Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*, (December 2016), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.003>
- Nobiron, I., Thompson, I., Brownlie, J., & Collins, M. E. (2003). DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine*, 21(17–18), 2091–2101. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00745-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00745-4)
- Parra J. Influencia de la infección por el virus de la diarrea viral bovina (DVB) y de la coinfección con el virus de leucosis bovina, leptospira y rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) sobre la producción en ganado de leche. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia 1994

- Pecora, A., Malacari, D. A., Ridpath, J. F., Aguirreburualde, M. S. P., Combessies, G., Odeón, A. C., ... Wigdorovitz, A. (2014). Research in Veterinary Science First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Research in Veterinary Science*, *96*(1), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.004>
- Peterhans, E., Bachofen, C., Stalder, H., & Schweizer, M. (2010). Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): Emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary Research*, *41*(6). <https://doi.org/10.1051/vetres/2010016>
- Pizarro-lucero, J. (2006). Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile, *115*, 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.009>
- Potgieter, L. N. D. (1997). Bovine Respiratory Tract Disease Caused by Bovine Viral Diarrhea Virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *13*(3), 471–481. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30309-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30309-1)
- Ramos, A. E., Muñoz, M., Moreno-Pérez, D. A., & Patarroyo, M. A. (2017). pELMO, an optimised in-house cloning vector. *AMB Express*, *7*(1), 26.
- Rambaut, A. (2012). FigTree v.1.4.0.
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D. & Drummond, A. J. (2014). Tracer v1.6
- Rappuoli, R., Bottomley, M. J., D’Oro, U., Finco, O., & De Gregorio, E. (2016). Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *Journal of Experimental Medicine*, jem-20151960.
- Ridpath, J. F. (2005). Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Preventive Veterinary Medicine*, *72*(1–2), 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.003>
- Ridpath, J. F. (2010). Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, *26*(1), 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.007>
- Ridpath, J. F., & Bolin, S. R. (1998). Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, *12*, 101–106.

<https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0158>

- Ridpath, J. F., & Neill, J. D. (2000). Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhea viruses. *Journal-of-Virology*, *74*(18), 8771–8774.
- Ridpath, J., & Fulton, R. (2010). Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States, *191*, 184–191.
- Rondon, I. (2006). Revision De Literatura Diarrea Viral Bovina : Patogénesis E Inmunopatología Bovine Viral Diarrhea : Pathogenesis and Immunopathology. *Universidad de Los Llanos*, *11*(1), 694–704.
- Sandvik, T. (2005). Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes, *72*, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.015>
- Schmidt, H.A., K. Strimmer, M. Vingron, and A. von Haeseler (2002) TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics*. **18**:502-504
- Silveira, S. (2017). HoBi-like is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil, (May), 1–8. <https://doi.org/10.1111/tbed.12689>
- ST Louis Marie-claude. (2005). Original article The bovine viral diarrhea virus (BVDV) NS3 protein , when expressed alone in mammalian cells , induces apoptosis which correlates with caspase-8 and caspase-9 activation, *36*, 213–227. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Strimmer, K., and A. von Haeseler (1997) Likelihood-mapping: A simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.**94**:6815-6819.
- Tajima, M. (2001). Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhea virus in Lower Saxony , Germany, *76*, 31–42.
- Vargas, D. (2010). *CONSTRUCCIÓN DE UN ADENOVECTOR QUE EXPRESE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (BVDV)*. *Universidad Nacional de Colombia*.

- Vargas, D. S., Jairo, J., & Vera, V. J. (2009). Perspectivas para el control del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 677–688.
- Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., & Paton, D. J. (2005). Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1–2), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.004>
- Vilcek, S., Herring, A. J., Herring, J. A., Nettleton, P. F., Lowings, J. P., & Paton, D. J. (1994). Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*, 136(3–4), 309–323. <https://doi.org/10.1007/BF01321060>
- Walz, P. H., Bell, T. G., Wells, J. L., Grooms, D. L., Kaiser, L., Maes, R. K., & Baker, J. C. (2001). Relationship between degree of viremia with experimentally induced bovine viral diarrhea virus infection, 62(7).
- Weber, M. N., Silveira, S., Machado, G., Groff, F. H. S., Mósen, A. C. S., Budaszewski, R. F., ... Canal, C. W. (2014). High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Research*, 191, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.035>
- Workman, A. M., Heaton, M. P., Harhay, G. P., Smith, T. P. L., Grotelueschen, D. M., Sjeklocha, D., ... Chitko-mckown, C. G. (2016). from persistently infected U . S . beef calves with complete genome sequence. <https://doi.org/10.1177/1040638716654943>
- Yeşilbağ, K., Alpay, G., & Becher, P. (2017). Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. *Viruses*, 9(6), 128.

Apéndices

Apéndice A. Protocolo extracción del cartilago de oreja en bovinos



PROYECTOS PILOTO DE EXCELENCIA SANITARIA EN GANADERIA BOVINA

Requisitos para la colección de muestras de orejas para el diagnóstico de animales persistentemente infectados a Diarrea Viral Bovina (DVB).

Vecol S.A y el Laboratorio de Virología de la Universidad Javeriana se encuentran realizando un trabajo para la determinar la prevalencia de animales persistentemente infectados a DVB (Diarrea Viral Bovina o BVD en inglés). Para esto es necesario tomar muestras de orejas de animales negativos a la técnica de ELISA (El listado de animales requeridos será enviado a cada uno de los coordinadores). Esta estrategia requiere que se obtengan las muestras de la manera más aséptica (limpia) posible, para evitar la contaminación con el virus de DVB que se encuentra en el medio ambiente, o debido a previas vacunaciones.

Materiales y Equipos:

- Pinzas para muescas y/o sacabocados
- Tubo tapa roja o Contenedor (Vial) para muestras individuales.
- Desinfectante para limpiar la herramienta de hacer las muestras: 10% Cloro (por ejemplo, 100ml (3oz) de cloro en 900ml (27oz) de agua).
- Agua limpia para enjuagar: balde de 3-5 galones. Cambie el agua cada 10-20 muestras.
- Utilice guantes desechables y vista overoles limpios.

Procedimiento de colección de la muestra:

Identifique el tubo de tapa roja o vial con el número de identificación del animal y con el número de caso. Y relacionarlo en el documento de remisión de muestras. Anexo al final de este documento.



Moje la herramienta en el desinfectante, luego enjuágala con mucha agua. **Precaución: desinfectante residual en la herramienta hará que las muestras den RESULTADOS FALSOS POSITIVOS. Es por ello, que enjuagar la herramienta es tan importante.**

Tome la muestra de oreja. Asegúrese tomar la muestra en la punta o extremo de la oreja, además es preferible que esta zona este limpia.

Coloque la muestra de oreja en el tubo. Este debe estar limpio, seco y no debe de tener ningún aditivo, como formalina u otro gel separador. No utilice los tubos con snap-cap que se usan para las muestras de leche o bolsas whirl-pac.

Precaución: las muestras de oreja deben de ser tomadas de la manera más aséptica posible, evite el contacto con heces fecales, leche, la tinta de tatuaje o la vacuna contra la DVB. Mantenga las muestras por un máximo de 72 horas en el refrigerador. (Tomar muestras de Lunes a Miércoles y enviar los Jueves). Envíe las muestras por servicio de mensajería de aeropuerto – aeropuerto en cavas con geles refrigerantes. A nombre de Alejandra Arias o Hugo Camargo.

Apéndice B. Analisis bioinformatico de los primers 324F y 326 R. Tamaño esperado 288pb

JQ612705.1:1-400	GTATACGCCCGGTAGCTCATGTGCGC--GTATATGATTGGGTATCCCAAATTAATGATT	58	
NC_003679.1:1-400	--GTATACGGGAGTAGCTCA--TGCCCGTATACAAAATTGGATATCCAA-AACTCGATT	55	
GQ888686.2:1-400	--GTATACGAGATTAGCTAAAGTACTCGTATACGGATTGGACGTTGACAAAATTTGAAT	58	
DQ088995.2:1-400	-----ATTCGCCCTTCTCGTATACGTATTGGGGCAATTAATAATAATTA	46	
F	-----	0	
JQ612705.1:1-400	TGGT---TTAGGGACTAAATTCCCCTAGCGAAGGCCGAAATAGGTTAACC CATACCTTCAG	115	
NC_003679.1:1-400	-----GGGTTAGGGAGCCCTCCTAGCGACGGCCGAACCGTGTAAACCATACACGTAG	107	
GQ888686.2:1-400	TGAAAATGTAGGGAATCTTCCCTCAGCGAAGGCCGAAAAGAGGCTAACCCAGCCCTTAG	118	
DQ088995.2:1-400	GGCCTAGGGAACAAAAGTCCCCCTCAGCGAAGGCCGAAAAGAGGCTAGCCATGCCCTTAG	106	
F	-----ATGCCCWTAG	10	
JQ612705.1:1-400	TAGGACGAGCATA-ATGGGGACTAGTGGTAGCAGTGAAGCTCCTTGGATTACCGAAGCCC	174	 Primers
NC_003679.1:1-400	TAGGACTAGCAGA-CGGGAGGACTAGCCATCGTGGTGAGATCCCTGAGCAGTCTAAATCC	166	
GQ888686.2:1-400	TAGGACTAGCAAAAGGAGGGGACTAGCCGTAGCAGTGAATTCATGGATGGCCGAACCCC	178	
DQ088995.2:1-400	TAGGACTAGCATAAAGAGGGGGTAGCAGCAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGCTTAAGCCC	166	
F	TAGGACTAGCA-----	21	
JQ612705.1:1-400	CGAGTACGGGGTAGTCGTCAATGGTTCGACGCATCA---- AGGAATGCCTCGAGATGCC	229	
NC_003679.1:1-400	CGAGTACAGGATAGTCGTCAATGGTTCGACGCAGGC--ACGGTTCGCCTTGAGATGCT	223	
GQ888686.2:1-400	TGAGTACAGGGGAGTCGTCAATGGTTCGACACTCCTTCAGTTAAGGAGTCTCGAGATGCC	238	
DQ088995.2:1-400	TGAGTACAGGGTAGTCGTCAATGGTTCGACGCCTTG--GAATAAAGGTCTCGAGATGCC	223	
F	-----	21	
JQ612705.1:1-400	ATGTGGACGAGGGCGTCCACCGGTGAATCTTAACCTCAAGCGGGGGCCGCTGGGTGAAA	289	
NC_003679.1:1-400	ACGTGGACGAGGGCATGCCAAGACTTGCTTTAATCTCGGGGGGGTGCAGAGGTGAAA	283	
GQ888686.2:1-400	ATGTGGACGAGGGCATGCCACGGCACATCTTAACCATGCGGGGGTGCATGGGTGAAA	298	
DQ088995.2:1-400	ACGTGGACGAGGGCATGCCAAGCACATCTTAACCTGAGCGGGGTGCAGAGGTAAAA	283	
F	-----	21	
JQ612705.1:1-400	GAGGGTCATTATGTGGCTCTTTGGGAGTACAGCCTGATAGGGTGTTCAGAGACCTGCTA	349	
NC_003679.1:1-400	ACACCT-----AACGGTGTGGGGTACAGCCTGATAGGGTGTTCAGAGAGCCACGA	336	
GQ888686.2:1-400	GCGCCAT--T---CGTGGCGTTATGGACACAGCCTGATAGGGTGTTCAGAGAGCCTGCTA	353	
DQ088995.2:1-400	GCAGTTCATA---CCGACTGTTACGGATACAGCCTGATAGGGTGTTCAGAGAGCCACTG	340	
F	-----	21	
JQ612705.1:1-400	CATCACTAGTAT-AAAACTCTGCTGTACATGGCACATGGAATTGTTAAACT-----	400	
NC_003679.1:1-400	ATAGGCTAGTATAAAAACTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGAACAAGTTTGAACCT	396	
GQ888686.2:1-400	TCCCGCTAGTA--AAAACTCTGCTGTACATGGCGCATGGAGTTGTTTT-----	400	
DQ088995.2:1-400	TTCTGTACTA--AAAACTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGATCACAATGAACCT	398	
F	-----	21	
R	-----GTACATGGCACATGGAGTTGA-----		



Primers

Región
amplificada



Apéndice C. Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la RT-PCR

Random			
Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Final
Random primers	3000 ng/uL	50 ng/uL	4 uL

RT			
Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Final
Agua	NA	NA	5 uL
Buffer	5X	1X	4 uL
dNTPs	10 mM	0,5 mM	1 uL
RNA sin	40 u/uL	10 u/uL	0,5 uL
MVL-RT	200 u/uL	5 u/uL	0,5 uL

PCR			
Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Final
Agua	NA	NA	12.1 uL
Buffer	10X	1X	2,5 uL
dNTPs	10 mM	0,5 mM	1,25 uL
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1 uL
Primer 324F	20 uM	1,5 uM	1,875 uL
Primer 326R	20 uM	1,5 uM	1,875 uL
Taq-Platinum	5 u/uL	0,08 u/uL	0,4 uL

Apéndice D. Secuencias de referencia utilizadas en la construcción de la filogenia.

GenBank ID	País de Origen	Genotipo	Referencia
DQ088995	ALEMANIA	1	Jones, 2006
M31182	NADL	1	Colett, 1998
KC757383	KOREA	1	Joo, 2013
KC853440	SUIZA	1	Marques Antunes de Oliveira, 2013
KR029825	EGYPTO	1	Soltan, 2015
KT355592	USA	1	Nam, 2015
AF220247	ALEMANIA	1	Becher, 2000
NC_002032	USA	2	Chen, 2000
AB894424	JAPON	2	Kozasa, 2015
HG426494	ALEMANIA	2	Jenckel, 2014
KJ000672	CHINA	2	Wang, 2014
KX838370	INDIA	2	Mishra, 2016
JX985409	SUECIA	3	Zhou, 2012
KC297709	CHINA	3	Gao, 2016
KY767958	BRASIL	3	Silveira, 2017
NC_012812	USA	3	Liu, 2009
JQ612704	ITALIA	3	Decaro, 2012

Apéndice E. Secuencias colombianas de BVDV de este estudio sometidas al Genbank

Dear GenBank Submitter:

Thank you for your direct submission of sequence data to GenBank. We have provided GenBank accession numbers for your nucleotide sequences:

BankIt2104681 COL10FLORENCIA	MH198299
BankIt2104681 COL17FLORENCIA	MH198300
BankIt2104681 COL19FLORENCIA	MH198301
BankIt2104681 COL1FLORENCIA	MH198302
BankIt2104681 COL28PUERTO-BERRIO	MH198303
BankIt2104681 COL29PUERTO-BERRIO	MH198304
BankIt2104681 COL30PUERTO-BERRIO	MH198305
BankIt2104681 COL44PUERTO-BERRIO	MH198306
BankIt2104681 COL45PUERTO-BERRIO	MH198307
BankIt2104681 COL49PUERTO-BERRIO	MH198308
BankIt2104681 COL89CAUCA	MH198309

The GenBank accession numbers should appear in any publication that reports or discusses these data, as it gives the community a unique label with which they may retrieve your data from our on-line servers. You may prepare and submit your manuscript before your accessions are released in GenBank.

Submissions are not automatically deposited into GenBank after being accessioned. Each sequence record is individually examined and processed by the GenBank annotation staff to ensure that it is free of errors or problems.

Apéndice G Tabla mostrando la información de animales y predios muestreados por departamento

Departamentos	Numero de animales muestreados	Predios
Caquetá	40	5
Antioquia	53	3
Cauca	47	20
Huila	30	3
Sucre	90	14