

Ensayo de PCR en tiempo real basado en SYBR-Green I para la detección de herpesvirus bovino tipo 1

SYBR Green I Based Real-Time RT-PCR assay for the detection of bovine herpesvirus type 1



<http://opn.to/a/uSCxh>

Laiyen García Delgado ¹, Roxana Marrero-Perera ², Liani Coronado Báez ¹, Yoandri Hinojosa López ¹, Ana María Acevedo ¹, Damarys Relova Vento ¹, Armando Vega Redondo ¹, Carmen Laura Perera González ^{1*}

¹Grupo de Virología Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, CP 32 700, Mayabeque, Cuba.

²Grupo de Bacteriología-Parasitología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas, CP 32 700, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) infecta los tractos respiratorio y genital del ganado bovino y varias especies de rumiantes. La infección puede resultar en diferentes enfermedades como rinotraqueitis infecciosa bovina, vulvovaginitis pustular infecciosa en hembras y balanopostitis pustular infecciosa en machos, con un severo impacto económico en la producción ganadera. La infección produce diferentes cuadros clínicos como respiratorios, conjuntivitis, abortos, enteritis e infección sistémica fatal en terneros recién nacidos. Una de las características más importante del herpesvirus bovino tipo 1 es el establecimiento de una infección latente que puede ser reactivada bajo condiciones de estrés o por tratamientos con altas dosis de corticosteroides. El presente trabajo tuvo como objetivo el desarrollo de un ensayo de PCR en tiempo real basado en SYBR-Green I para la detección de herpesvirus bovino 1, mediante la amplificación de un fragmento del gen de la timidina quinasa viral. Se establecieron los parámetros de los componentes críticos de la reacción de PCR, así como de las condiciones termodinámicas. Mediante el análisis de la curva de disociación se verificó que las curvas de amplificación fueron específicas ($T_m = 93^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) y que no hubo amplificaciones inespecíficas. Se obtuvieron altos niveles de especificidad, repetibilidad y sensibilidad, con un límite de detección de 100.5 DICT₅₀/mL. Se evaluó la sensibilidad diagnóstica a partir de exudados nasales procedentes de animales de una reproducción experimental, de reactivación de la infección latente y de vaquerías experimentales. El ensayo de PCR en tiempo real con SYBR-Green I demostró ser más sensible para el diagnóstico de BoHV-1, que el ensayo de PCR en punto final y el aislamiento viral.

Palabras clave: herpesvirus bovino tipo 1, PCR en tiempo real, SYBR-Green I.

ABSTRACT: Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) infects the respiratory and genital tracts of cattle and several species of ruminants. The infection can result in different diseases such as infectious bovine rhinotracheitis, infectious pustular vulvovaginitis in females and infectious pustular balanopostitis in males, with a severe economic impact on livestock production. The infection causes respiratory symptoms, conjunctivitis, abortions, enteritis, and fatal systemic infection in newborn calves. One of the most important characteristics of bovine herpesvirus type 1 is the establishment of a latent infection that can be reactivated under stress conditions or by treatment with high doses of corticosteroids. The present work was aimed at developing an SYBR Green I Based Real-Time RT-PCR assay for the detection of bovine herpesvirus type 1, by amplifying a fragment of the viral thymidine kinase gene. The parameters of the critical components of the PCR reaction as well as the thermodynamic conditions were established. Dissociation curve analysis showed that the amplification curves were specific ($T_m = 93^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) and that there were no unspecific amplifications. High levels of specificity, repeatability and sensitivity were obtained, with a detection limit of 100.5 TCID₅₀/mL. Diagnostic sensitivity was assessed on the basis of nasal exudates from experimental breeding animals, reactivation of latent infection and experimental dairy farms. The SYBR Green I Based Real-Time RT-PCR assay proved to be more sensitive for the diagnosis of BoHV-1 than the endpoint PCR assay and virus isolation.

Key words: bovine herpesvirus type 1, real-time PCR, SYBR-Green I.

*Autor para la correspondencia: Carmen Laura Perera González. E-mail: claura@censa.edu.cu

Recibido: 10/08/2019

Aceptado: 25/10/2019

INTRODUCCIÓN

El control de las enfermedades infecciosas, que provocan pérdidas devastadoras en las especies animales de interés económico, constituye uno de los principales objetivos de los servicios veterinarios internacionales para garantizar la seguridad alimentaria (1). En este sentido, el diagnóstico rápido y confiable de los patógenos involucrados es un elemento de gran importancia.

En el ganado bovino ocurren infecciones virales que afectan el desempeño productivo de esta especie (2). En Cuba, entre los virus de mayor incidencia se encuentra el BoHV-1, que es uno de los patógenos más importantes que afecta los sistemas respiratorio y reproductivo de los bovinos, independientemente de la raza y la edad (3,4), con una incidencia negativa en los costos de producción de carne y leche y provoca bajas tasas de fertilidad a consecuencia de los altos índices de abortos (5,6).

El BoHV-1 afecta al bovino y provoca la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), enfermedad respiratoria caracterizada por rinitis, traqueitis y fiebre, así como la vulvovaginitis/balanopostitis pustular infecciosa (IVP/IBP) que provoca enfermedades en el tracto reproductivo (7).

Este virus se aisló por primera vez en Cuba de terneros con infección respiratoria (8); posteriormente se aisló de vacas con endometritis (9), de fetos abortados (10,11), de lavados prepuciales de toros con infección subclínica (12) y de muestras de semen (13).

Para disminuir el riesgo de diseminación de las enfermedades causadas por este virus y tomar las medidas de control adecuadas, resulta necesario disponer de ensayos rápidos, sensibles y específicos. Durante muchos años el aislamiento viral (AV) ha sido el estándar de oro para el

diagnóstico del virus, pero requiere de mucho tiempo para obtener el diagnóstico final y de facilidades para cultivos celulares, con engorrosos procedimientos de trabajo (14).

En la actualidad el diagnóstico molecular, y más específicamente la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rPCR), han desplazado al AV para muchos patógenos y se ha convertido en el estándar de oro para muchas enfermedades y agentes virales (15). La Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) considera el rPCR como el método recomendado para la confirmación de casos clínicos de BoHV-1 (16). Estos ensayos, además de tener elevadas sensibilidad y especificidad, reducen el riesgo de contaminaciones cruzadas (17). El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un ensayo rPCR basado en SYBR-Green I para la detección de BoHV-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus

Las cepas de referencia y aislados de campo empleados en este estudio se listan en la [Tabla 1](#).

Propagación de virus

Los aislados de campo y las cepas E8 (BoHV-1), Phylaxia (BoHV-2) y B4 (BoHV-5), se cultivaron en la línea celular de riñón bovino (MDBK), según los procedimientos estándares que se describen en el Manual de Ensayos de Diagnósticos y Vacunas para Animales Terrestres (16). Luego de 72 horas de incubación a 37°C, el virus fue colectado mediante tres ciclos de congelación-descongelación y se conservó a -70°C hasta ser usado para la extracción del ADN. En el caso del aislado cubano V208, proveniente del virus de la pseudorrabia (PRV),

Tabla 1. Aislados de campo y virus empleados./ *Field isolates and viruses used.*

Virus	Cepa de referencia/ Aislado viral	Procedencia
BoHV-1	E8/aislado cubano	CENSA, Cuba
BoHV-2	Phylaxia	Instituto de Medicina Veterinaria, Hungría
BoHV-5	B4/aislado cubano	CENSA, Cuba
ADV-8	Misk/67	Instituto de Medicina Veterinaria, Hungría
ADV-9	Sofia	Instituto de Medicina Veterinaria, Hungría
PRV	V208/aislado cubano	CENSA, Cuba

se cultivó en la línea celular de riñón porcino (PK-15) (ATCC, CCL 33), siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Las cepas Misk/67 y Sofia, pertenecientes al Adenovirus bovino-8 (ADV-8) y Adenovirus bovino-9 (ADV-9), respectivamente, fueron gentilmente donadas por el Laboratorio de Virología del Instituto de Medicina Veterinaria, Phylaxia, Hungría.

Muestras

Inoculación experimental en terneros

Se emplearon tres terneros mestizos Holstein entre tres y cinco meses de edad clínicamente sanos. Durante todo el experimento los animales se mantuvieron en condiciones de bioseguridad y con alimentación *ad libitum*. Los terneros se inocularon por la vía intranasal con 2 mL de un sobrenadante de cultivo celular en cada nostril, con la cepa E8 de BoHV-1, cuyo título fue de $10^{6.5}$ EID₅₀/mL. A todos los animales se les realizó inspección clínica durante el experimento, que se basó en la evaluación diaria de los siguientes aspectos: la presencia o ausencia de secreciones y el aspecto de las mucosas nasales y conducta ante el alimento. Se tomaron muestras de exudado nasal (ambas fosas nasales) en el momento antes de la inoculación y a partir de las 48 horas p.i hasta el día 15 p.i. El protocolo del experimento se aprobó por el comité de ética del CENSA con el objetivo de garantizar el menor sufrimiento de los animales.

Reactivación de la infección latente en novillas

La reactivación de la infección latente se realizó aplicando dexametasona a razón de 0,11 mg/Kg de peso durante cinco días en tres novillas mestizas Holstein. Se tomaron muestras de exudado nasal (ambas fosas nasales) a partir del sexto día hasta el 21 día posterior a la inmunosupresión.

Muestras procedentes de animales en condiciones de producción

Se colectaron 165 muestras de exudados nasales provenientes de bovinos de cuatro vaquerías de experimentación pertenecientes a la

provincia Mayabeque. En el momento de la toma de muestra, en tres de ellas los animales tenían, como único signo clínico, ligeras secreciones nasales; el resto de los animales muestreados no presentaban ningún signo clínico.

Cebadores utilizados en el ensayo de rPCR

Se utilizaron los cebadores descritos por Rodríguez *et al.* (18) para BoHV-1: 514 S21, GCG GGC CTG GTT GCG TAC TAC y 695 S21, AGC AGA TCT TCC GCG TTG ATC que amplifican una región de 220 pb del gen de la timidina quinasa. La T_m del producto de amplificación se estimó con el empleo del paquete de programas Oligo, versión 7 (Análisis Molecular de Biología, Inc., E.U.A). Esta estimación se realizó mediante el análisis de la pareja de cebadores consecuencias disponibles en la base de datos GenBank.

Extracción de ADN

El ADN de las cepas de referencia, de las muestras de los aislados de campo y de las obtenidas de animales experimentales y de campo, se extrajo a partir de 120 µL del sobrenadante obtenido de los cultivos celulares y de los exudados nasales. La extracción se realizó con el uso del juego de reactivos Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Madison, WI, E.U.A), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN se resuspendió en 10 µL de agua libre de nucleasas (Promega, Madison, WI, E.U.A.) y se conservó a -80°C hasta su uso.

PCR en tiempo real

Todos los análisis de rPCR se realizaron en la plataforma LightCycler 2.0® (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Se realizaron un grupo de experimentos para optimizar los protocolos, incluyendo concentraciones de reactivos y parámetros de termoperfil. La reacción de amplificación contenía 5 µL del ADN molde, 1 µL de cada uno de los cebadores para los cuales se evaluaron las siguientes concentraciones 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 µM; 2 µL de LightCycler® FastStart DNA master SYBR-Green I (10X) (Roche), 8 µL de MgCl₂ del que se

evaluaron las siguientes concentraciones: 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 mM y agua libre de nucleasas (Promega, Madison, WI, E.U.A.) para un volumen final de 20 μ L para cada reacción.

El termoperfil empleado fue el siguiente: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 s; se evaluaron tres temperaturas de alineamiento 58°C, 60°C y 62°C por 10 s y elongación a 72°C por 20 s con adquisición de dato fluorescente. Después de los ciclos de PCR, se generó una curva de disociación (0 s a 95°C, 15 s a 65°C, 0 s a 95°C) para discriminar entre los amplicones específicos y los productos de amplificación no específicos. Los picos de disociación se visualizaron al graficar la primera derivada negativa de la fluorescencia contra la temperatura ($-dF/dT$ versus T), lo cual se obtiene con el empleo del programa LightCycler® 4.05.415 (Roche AppliedScience, Mannheim, Alemania). El valor de T_m se definió como el punto máximo de la curva.

Sensibilidad analítica

Para determinar el límite de detección del ensayo se realizaron diluciones seriadas en base 10 en sobrenadantes de exudados nasales negativo de la cepa E8 de BoHV-1 con título de 10^{6.5} EID₅₀/mL. De cada dilución se extrajo el ADN viral que se empleó como molde para el ensayo de rPCR. Cada dilución se evaluó por triplicado.

Especificidad analítica

Se determinó evaluando ADN de diferentes herpesvirus bovinos: BoHV-1, BoHV-2 y BoHV-5 y otros virus que causan un cuadro clínico similar al BoHV-1 como PRV, ADV-8 y ADV-9 ([Tabla 1](#)).

Repetibilidad y variabilidad intra e interensayo

La repetibilidad del ensayo de rPCR basado en SYBR Green I se determinó con el empleo de tres muestras, una muestra positiva fuerte (10⁵ EID₅₀/mL), una muestra positiva media

(10³ DICT₅₀/50 μ L) y una muestra positiva baja (10² EID₅₀/mL). Las tres muestras se obtuvieron diluyendo la cepa E8 de BoHV-1 en exudado nasal negativo a este virus. Para determinar la variabilidad intraensayo, cada dilución se evaluó por triplicado. Para medir la variabilidad interensayo, cada dilución se evaluó en tres corridas diferentes realizados por dos operadores diferentes en días diferentes. La Desviación Estándar (DS) se calculó con el programa LightCycler® 4.05.415 (Roche AppliedScience, Mannheim, Alemania) y el coeficiente de variación (CV) se determinó según la fórmula: $CV = (SD[\text{valor de Ct}]/\text{Media}[\text{valor de Ct}]) \times 100$, de acuerdo con las guías previamente publicadas (E.U.A. Environmental Protection Agency, 2004).

PCR en punto final

Los ensayos de PCR convencional o en punto final se realizaron en un volumen de reacción de 50 μ L que incluyó: 2 μ L de muestra de ADN, 1xGoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, E.U.A.) (10 μ M de cada dNTP, 1 mM MgCl₂, pH 8.5) y 0,6 μ M de cada cebador. La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de incubación de 5 min a 94°C seguido de 35 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a 62°C y 30 s a 72°C) y un ciclo de 7 min a 72°C.

Aislamiento viral

Se utilizaron células MDBK, que se mantuvieron en medio DMEM (SIGMA) con 10 % de suero fetal bovino (Hyclone) a una concentración final de 0,5 %. La inoculación se realizó según la metodología descrita en el Manual de Ensayos de Diagnósticos y Vacunas para Animales Terrestres ([16](#)) que se detalla a continuación: se emplearon placas de 96 pozos y en cada pocillo se adicionaron 50 μ L de medio de cultivo con una concentración final de 10 % de suero fetal. Se realizaron diluciones seriadas en base 10, en medio de cultivo desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁹. Se adicionaron 50 μ L por pocillo de cada dilución previamente obtenida a razón de ocho

réplicas por dilución. Seguidamente, se adicionaron 100 μ L por pozo de una suspensión de células MDBK con una concentración de $3,5 \times 10^5$ células/mL. Las placas inoculadas se incubaron a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante tres días. La lectura se realizó a las 72 horas p.i y el título viral se calculó mediante el método de Reed y Muench (19).

Evaluación de las muestras

Las muestras de exudado nasal colectadas de los terneros inoculados y de las novillas con reactivación de la infección latente fueron evaluadas por el nuevo ensayo desarrollado, por la técnica de AV y por el PCR de punto final descrito por Rodríguez *et al.* (18). Las 165 muestras de exudados nasales procedentes de bovinos de las cuatro vaquerías de experimentación (I, II, III y IV) solo se evaluaron por el nuevo ensayo desarrollado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos de rPCR basados en SYBR Green I han demostrado ser una de las herramientas más efectivas en la detección rápida y diferenciación de una variedad de patógenos (20,21). Sin embargo, las reacciones basadas en este formato, por lo general, están sesgadas por el hecho de que se detecta, además, la amplificación de dímeros de cebadores (19). Por esta razón, se deben discriminar, con una elevada precisión, las amplificaciones específicas de aquellas que no lo son. Para cumplir este objetivo, en 1996 Roche AppliedScience incorporó, en el programa LightCycler®, el cálculo de la segunda derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura que facilitó la discriminación y cuantificación de los productos obtenidos con SYBR Green I, sin la necesidad de utilizar sondas específicas (22,23). Por este motivo un elemento de gran importancia es conocer la T_m específica teórica para el amplicón resultante de la pareja de cebadores que se va a emplear en un ensayo. Los cebadores seleccionados en este ensayo amplifican una región de 202 pb que abarcan desde el nucleótido 514 hasta el 716 del gen tk de BoHV-1. Con el empleo del programa Oligo versión 7.0 se obtuvo la T_m específica teórica

para el amplicón resultante. En este caso, el valor obtenido de T_m fue de 93,7°C, lo que puede tener una diferencia de hasta 1°C con la temperatura *in vitro*.

Las diferencias que pudieran existir entre las T_m teórica y la T_m *in vitro* están fundamentadas por la contribución de los iones Mg₂₊ en el medio, así como de los monocationes y dNTPs libres, parámetros que por lo general son subestimados por los programas de evaluación de cebadores. Este resultado indica que la temperatura óptima del ensayo debe seleccionarse experimentalmente, aunque puede ser orientada por cálculos teóricos.

Finalmente, las concentraciones de cebadores y MgCl₂ establecidas en este ensayo fueron 0,4 μ M y 5 mM, respectivamente. La mezcla del PCR final contenía 0,4 μ M de cada cebador, 2 μ L de FastStart DNA Master SYBR Green I (3,2 μ L de MgCl₂ 25 mM) (concentración final de 5 mM), 5 μ L del ADN molde; la temperatura óptima de alineamiento seleccionada fue de 58°C.

En la evaluación de la sensibilidad analítica, el ensayo de rPCR mostró curvas de amplificación con curvas de disociación específica de 93°C \pm 1°C. El límite de detección del ensayo de rPCR basado en SYBR Green I fue 10^{0.5} DICT₅₀/ml (Figura 1). Esta amplificación fue también confirmada por la detección de una banda de 202 pb en electroforesis de gel de agarosa en las diluciones desde 10^{6.5} hasta 10^{0.5} (Figura 2). El límite de detección resultó ser en dos órdenes superior al obtenido por el ensayo de PCR en punto final reportado por Rodríguez *et al.* (18) (10^{2.45} DICT₅₀/ml), donde se emplean los mismos cebadores que los utilizados en este ensayo. Este valor demuestra la elevada sensibilidad analítica de los ensayos de rPCR que garantizan la detección del agente, aun en cargas virales muy bajas (24).

Todas las muestras con valor de Ct por debajo de 35, con una curva de amplificación que presenten un incremento exponencial y que la temperatura de disociación específica presente un pico de 93°C \pm 1°C se consideraron positiva para BoHV-1.

El ensayo también resultó ser específico, ya que solo se obtuvo una curva de amplificación con un valor de temperatura de disociación de 93,01°C con la cepa E8 de BoHV-1. El ensayo no

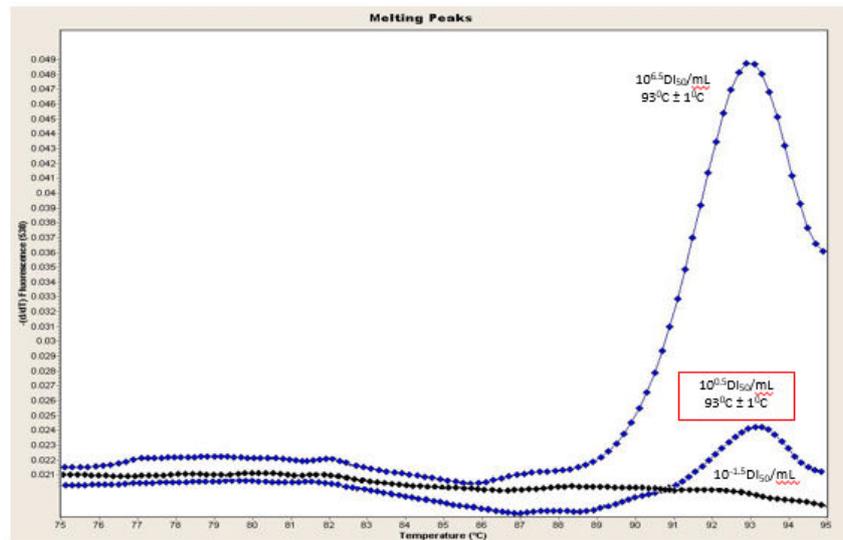


Figura 1. Sensibilidad analítica basada en dosis infecciosas de la cepa E8 del herpesvirus bovino 1 para el nuevo ensayo. Curvas de disociación específicas para diferentes diluciones de la cepa E8, que incluyeron la concentración inicial de la que se partió y las concentraciones menores. El límite de detección se señala en un rectángulo rojo. / *Analytical sensitivity based on infective doses of BHV1 strain E8 for the new assay. Specific dissociation curves for different dilutions of E8 strain, including the initial concentration and the lower concentrations. The detection limit is marked in a red rectangle.*

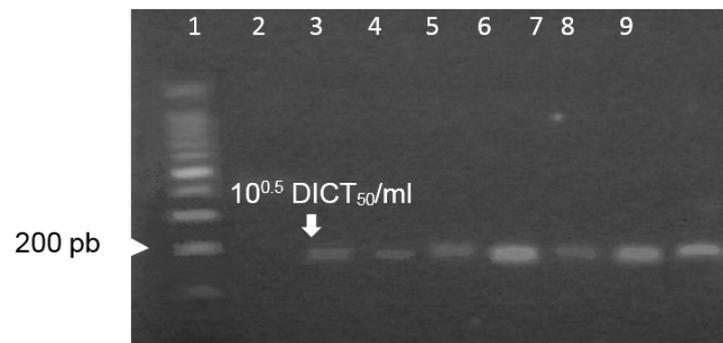


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para herpesvirus bovino 1. Línea 1: Patrón de peso molecular 100pb (Promega); 2 - 8: diluciones seriadas desde $10^{-1.5}$ - $10^{6.5}$. / *2% agarose gel electrophoresis of real time PCR products for bovine herpesvirus type 1. Line 1: Molecular weight marker 100pb (Promega); 2 - 8: Serial dilutions from $10^{-1.5}$ - $10^{6.5}$.*

amplificó el ácido nucleico del resto de los virus evaluados, dentro de los que se encontraron virus homólogos como el BoHV-2 y BoHV-5 (Tabla 1) y virus heterólogos que ocasionan un cuadro clínico similar al del BoHV-1. Los productos de amplificación obtenidos a partir del rPCR evaluado, al ser corridos en un gel de agarosa, solo produjeron bandas de la talla esperada (202 pb) para el BoHV-1 (Figura 3).

El ensayo de rPCR desarrollado demostró una alta repetibilidad con CV dentro de las corridas (variabilidad intraensayo) y entre corridas (variabilidad interensayo) en el rango de 0,1 a

0,7 % y 0,8 a 1,9 %, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango permitido para este tipo de ensayo $CV < 2\%$ para la repetibilidad intraensayo y $CV < 3\%$ interensayo (25). Los valores obtenidos en el estudio de repetibilidad convierten al ensayo rPCR desarrollado en una herramienta muy útil y sustentan el uso de este sistema de diagnóstico (25).

Los terneros de la reproducción experimental mostraron un cuadro clínico muy similar entre ellos; los signos clínicos más característicos son el lagrimeo, la congestión nasal y las secreciones

nasales, las que se presentaron entre dos y cinco días p.i. En el caso de las secreciones nasales, primeramente se presentaron como secreciones serosas (Figura 4A) y más tarde se tornaron mucopurulentas. En todos los animales se observó secreción ocular serosa y opacidad de la córnea (Figura 4B). La presencia de signos clínicos a nivel del tracto respiratorio superior y de conjuntivitis, ya sea uni o bilateral, es característico de las infecciones por herpesvirus en el bovino (26,16,27,28). Según la clasificación

de Young (29) sobre las infecciones por BoHV-1 en subclínicas, leves o severas, este cuadro clínico se corresponde con una infección de tipo leve.

Los terneros a los que se les reactivó la infección latente no mostraron sintomatología clínica característica de infección por herpesvirus. No presentaron hiperemia de las mucosas, fiebre, ni pérdida del apetito. Varios autores han reportado que es frecuente la no presentación de cuadro clínico en los animales

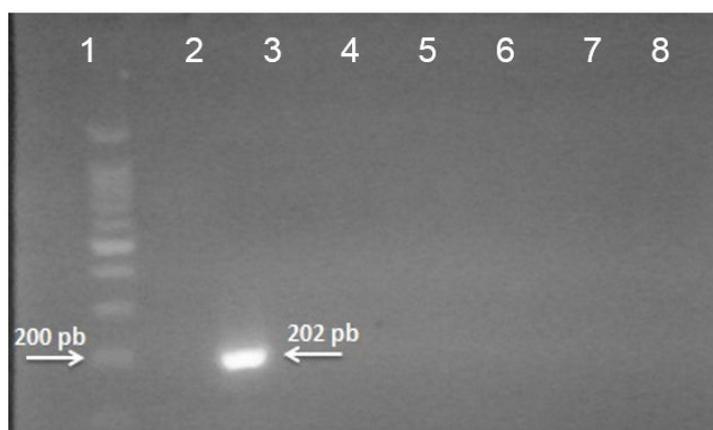


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa a 2 % para la verificación de los productos de amplificación obtenidos por el ensayo rPCR basado en SYBR-Green I para la detección de herpesvirus bovino 1 frente a virus homólogos y heterólogos. Línea 1: Patrón de peso molecular 100 pb (Promega); Línea 2: Cepa E8 (BoHV-1); Línea4: Phylaxia (BoHV-2); Línea5: Cepa B4 (BoHV-5); Línea 6: V208 (PRV); Línea 7: Misk/67 (ADV-8); Línea 8: Sofia (ADV-9)./ *2 % agarose gel electrophoresis for the verification of amplification products obtained by SYBR Green I Based Real-Time RT-PCR assay for the detection of bovine herpesvirus type 1 against homologous and heterologous viruses. Line 1: Molecular weight marker 100 bp (Promega); Line 2: E8 strain (BoHV-1); Line 4 Phylaxia (BoHV-2); Line5: Strain B4 (BoHV-5); Line 6: V208 (PRV); Line 7: Misk/67 (ADV-8); Line 8: Sophia (ADV-9).*

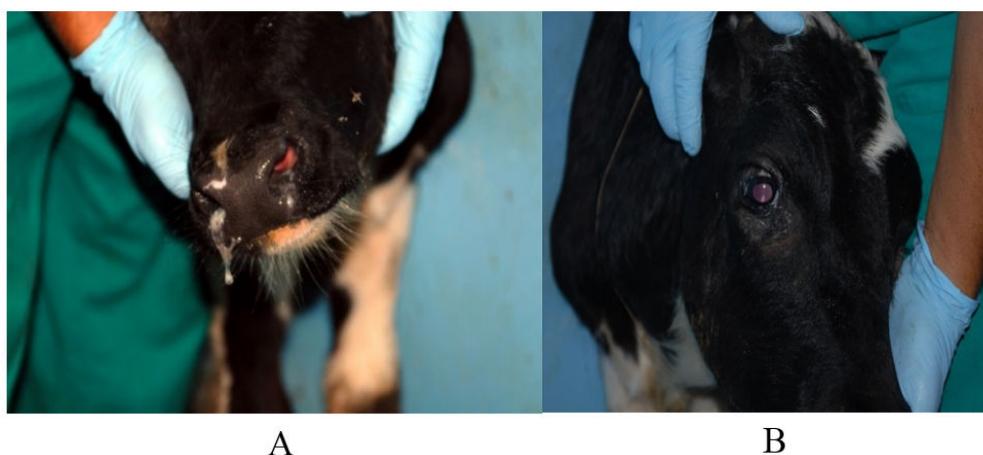


Figura 4. Síntomas clínicos respiratorios en terneros inoculados con la cepa E8 de herpesvirus bovino 1. A: Congestión nasal y secreción serosa, B: ligera opacidad de la córnea./ *Respiratory clinical symptoms in calves inoculated with E8 strain of bovine herpesvirus type 1 A: nasal congestion and serous secretion, B: slight opacity of the cornea.*

inmunodeprimidos durante la reexcreción de virus latente (26,4). De manera que el panel de muestras quedó conformado por 93 muestras de exudados nasales procedentes de los animales con reactivación de la infección latente y de los animales inoculados, así como de 165 muestras procedentes de las vaquerías experimentales muestreadas.

De las 93 muestras colectadas, 78 fueron positivas a BoHV-1 por el nuevo rPCR desarrollado al evaluar el desempeño diagnóstico del ensayo frente al AV y el PCR de punto final (datos no mostrados), para 83,8 % de positividad. Sin embargo, solo 20 muestras (21,5 %) fueron positivas por AV y 39 positivas por PCR de punto final (41,9 %).

Es de destacar que todas las muestras positivas por AV se detectaron por el ensayo de rPCR desarrollado. Sin embargo, 58 muestras positivas por rPCR escaparon a la detección por AV (falsos negativos). Este resultado pudiera estar sustentado porque el AV puede no lograrse con cargas virales bajas. Las 20 muestras a partir de las cuales se obtuvieron los aislados presentaron valores de Ct inferiores a 29 por el ensayo de rPCR, lo cual sugiere que el AV solo es exitoso en muestras donde está presente una carga viral media o alta (30).

De igual forma, todas las muestras positivas por el ensayo de PCR en punto final fueron detectadas por el ensayo rPCR desarrollado. En este caso, 38 muestras positivas por rPCR resultaron negativas por el ensayo de PCR en punto final (falsos negativos). Se debe señalar que todas estas muestras tenían cargas virales bajas con valores de Ct que oscilaban entre 31 y 35. Este resultado demuestra una vez más que el rPCR es más sensible que el PCR en punto final, dado a su amplio rango dinámico que le permite detectar cantidades mínimas de ADN, aun aquellas que presenten bajas cargas virales (menos de cinco copias). Esto, a su vez, hace posible que se puedan analizar tamaños de muestra muy pequeños, ya que requiere 1000 veces menos cantidad de ADN que el PCR en punto final (31,32). Esta característica, junto a que la técnica combina dos pasos, el de amplificación del ADN y la detección al mismo tiempo sin necesidad de tener que requerir de geles de agarosa para detectar los productos

amplificados, constituye dos de las ventajas más importantes de este ensayo.

La diferencia encontrada en cuanto al elevado número de muestras positivas detectadas por el ensayo de rPCR, desarrollado con respecto al AV y al PCR en punto final, justifican que estos ensayos hayan desplazados al AV como “estándar de oro” para muchas enfermedades virales. De ahí que Hoffmann *et al.* (15) propongan los ensayos de rPCR como el ensayo de referencia para varias enfermedades virales que afectan animales de interés económico.

En el caso de las 165 muestras evaluadas de las cuatro vaquerías experimentales estudiadas, solo 12 exudados nasales resultaron positivos a la detección de BoHV-1. Es importante señalar que de ellos solo tres animales presentaban secreciones nasales en el momento de la toma de muestra. Las mismas se correspondían con vacas procedentes de la vaquería III. Los restantes nueve animales que dieron positivo no tenían ningún signo clínico característico de la enfermedad cuando se les tomó la muestra de exudado.

Estos resultados pudieran estar relacionados con una reactivación de la infección latente; tal y como está reportado por varios autores, donde por lo general los animales no presentan signos clínicos y la enfermedad cursa de un modo subclínico (4,26,33). En la mayoría de los exudados que resultaron positivos, los valores de Ct obtenidos fueron altos: oscilaron entre 32 y 35, por lo que se correspondían con bajas cargas virales. Solo dos presentaron valores de Ct por debajo de 29 (27,05 y 28,53) y se correspondieron con los animales que presentaban secreciones nasales en el momento de la toma de la muestra.

En el caso de la vaquería IV, donde todos los animales fueron negativos, es importante señalar que se correspondían con animales de la categoría de terneros y tenían entre tres y cuatro meses de edad. En estos animales está reportado que la probabilidad de encontrar animales positivos es muy baja, si se tiene en cuenta que los anticuerpos calostrales duran aproximadamente hasta los seis meses de vida del animal (33).

La elevada sensibilidad analítica, así como la repetibilidad y el desempeño del ensayo en

muestras clínicas experimentales y de campo, convierten el rPCR en una herramienta útil para la detección rápida, certera y específica de BoHV-1 en exudados nasales.

REFERENCIAS

1. FAO. Para lograr la seguridad alimentaria en la región es necesario controlar las enfermedades animales como la Peste Porcina Clásica. 2014; Roma, Italia: FAO.
2. González Lamar L. La Ganadería Vacuna en Cuba. Trabajo de Diploma. 2001. UNAH, La Habana, Cuba.
3. Campos F, Franco A, Hübner S, Oliveira M, Silv A. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Vet Mic.* 2009;139:67-73.
4. Malla JA, Chakravarti S, Gupta V, Chander V, Sharma GK, Qureshi S, et al. Novel Polymerase Spiral Reaction (PSR) for rapid visual detection of Bovine. *Gene.* 2018;6(44):107-112. doi: 10.1016/j.gene.2017.11.004.
5. Chatterjee S, Bakshi S, Sarkar N, Mitra J, Chowdhury S. Bovine herpes virus-1 and its infection in India - a review. *Indian J Anim.* 2016;1(55):21-40.
6. Asmare K, Sibhat B, Ayelef G, Gebremedhin E, Lidete K, Skjerve E. Serological evidence of bovine herpesvirus-1, Bovine viral Diarrhea virus and Schmallenberg virus infections in relation to reproductive disorders in dairy cattle in Ethiopia. *Acta Tropica.* 2018;178:236-241. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.12.005.
7. Givens M. Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal.* 2018;113:1-7.
8. Mesáros E, Luya MJ, Krenk K, Rodríguez R. Aislamiento del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR). *Revista del Centro Nacional de Investigaciones Científicas.* 1974;5:43-45.
9. Noda J, Vega A. Caracterización de una cepa del virus del complejo rinotraqueitis infecciosa bovina-vulvovaginitis pustular infecciosa (RIB-VPI). *Rev Salud Anim.* 1982;4(3):25-36.
10. Heredia N. Relación del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa (IBR-IPV) con trastornos reproductivos del ganado. Tesis de Doctorado. Instituto de Medicina Veterinaria. 1987; La Habana, Cuba.
11. Muñoz MC. Diagnóstico de aborto infeccioso bovino. Morfopatología fetal. Instituto de Ciencias Agropecuarias de La Habana. (Tesis de Doctorado). Instituto de Ciencias Agropecuarias de La Habana. 1996; La Habana, Cuba.
12. Ganges L, Barrera M, Cedeño I, Montalvo JM. Diagnóstico de Herpesvirus bovino-1 en toros mediante Inmunoperoxidasa e Inmunofluorescencia. *Rev Salud Anim.* 1997;19(1):51-52.
13. Rodríguez M, Barrera M, Sánchez O, Rodríguez EC, Martínez N, Parra NC, et al. First report of bovine herpesvirus 5 in bull semen. *Arch Virol.* 2012;157(9):1775-1778. doi: 10.1007/s00705-012-1334-7.
14. Greiser-Wilke I, Blome S, Moennig V. Diagnostic methods for detection of Classical swine fever virus-Status quo and new developments. *Vaccine.* 2007;25:5524-5530.
15. Hoffmann B, Beer M, Reid S, Mertens P, Oura C, Van P, et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organization for Animal Health. *Vet Microbiol.* 2009;139:1-23.
16. OIE. (2019). Rinotraqueitis Infecciosa Bovina/Vulvovaginitis Pustular Infecciosa Manual de Ensayos de Diagnósticos y Vacunas para Animales Terrestres. Paris, Francia. 2019: Capítulo 3.4.11.
17. Belák S. Molecular diagnosis of viral diseases present trends and future aspects: a view from the OIE Collaborating Centre for the application of polymerase chain reaction methods for diagnosis of viral diseases in veterinary medicine. *Vaccine.* 2007;25:5444-5452.
18. Rodríguez M, Delgado I, Alfonso A, Martínez N, Abeledo MA, Barrera M. Presencia de anticuerpos al virus de la leucosis bovina en rebaños pertenecientes a las

- provincias Occidentales y Centrales de Cuba. *Rev Salud Anim.* 2009;31(1):24-28.
19. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American J of Epidemiology.* 1938;27:493-497.
20. Acevedo A, Perera CL, Vega A, Rios L, Coronado L, Relova D, et al. A duplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of Massachusetts and non-Massachusetts serotypes of infectious bronchitis virus. *Molecular Cellular Probes.* 2013;27:184-192.
21. Pérez L, Perera CL, Frias MT, Nuñez J, Díaz H. A multiple SYBR Green I-based real-time PCR system for the simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, pseudorabies virus and Torque tenosus virus 1 and 2 in pigs. *J Virol Methods.* 2012;179:233-241.
22. Ririe K, Rasmussen R, Wittwer C. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analysis Biochemistry.* 1997;245:154-160.
23. Rodríguez M. Desarrollo y evaluación de un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de Herpesvirus bovino tipo 1. (Tesis de Maestría). Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria; La Habana, Cuba. 2007.
24. Haines F, Hofmann M, King D, Drew T, Crooke H. Development and Validation of a Multiplex, Real-Time RT PCR Assay for the Simultaneous Detection of Classical and African Swine Fever Viruses. *PLoS ONE.* 2013;7(8):7-19.
25. OIE. Validación y control de calidad de los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para animales terrestres. Paris, Francia. 2008: Capítulo 3.4.11.
26. Pidone CL, Galosi CM, Etcheverrigaray ME. Herpesvirus Bovinos 1 y 5. *Analecta Veterinaria.* 1999;19(1/2):40-50.
27. Vidal R. Estudio de la prevalencia de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) en las ganaderías bovinas del Cantón Loja. (Trabajo de Diploma), Cantón, Ecuador. 2016.
28. Borge R, Sevilla Y. Diagnóstico de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en la finca Cerro Bonito en la Comarca los Mollejones Santos Tomas Chontales. (Trabajo de Diploma); Managua, Nicaragua. 2017.
29. Young P, Sweeney J, Smith G, Rodwell B. Failure to detect infection of the bovine foetus after inoculation of a prototype Australian strain of bovine herpesvirus 1. *Australian Veterinary Journal.* 1994;71:92-93.
30. Pérez LJ, Díaz H, Tarradas J, Rosell R, Perera CL, Muñoz M. Development and validation of a novel SYBR Green real-time RT-PCR assay for the detection of classical swine fever virus evaluated on different real-time PCR platforms. *J Virology Methods.* 2011;174:53-59.
31. Mackay I, Adren K, Nitsche A. Survey and summary Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research.* 2002;30(6):1292-1305.
32. Dorak T. Real-time PCR. 2007. New York, USA: Madison Avenue.
33. Martínez E, Riera P, Sitja M, Fang Y, Oliveira S, Maldonado J. Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Res Vet Scient.* 2008;85:184-193.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Los autores de este trabajo declaran presentar una participación igualitaria en la concepción, ejecución y escritura de la investigación.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)