

# Aislamiento e identificación del virus de la lengua azul por primera vez en Cuba



## Isolation and identification of bluetongue virus by first time in Cuba

<https://cu-id.com/2248/v45e10>

Ana María Acevedo Beiras<sup>1\*</sup>, Maray Curiel Hernández<sup>1\*</sup>, Cristian Díaz Corona<sup>1</sup>, Yalainne Obret Ferrer<sup>1</sup>,  
 María Teresa Frías Lepoureau<sup>1</sup>, Carmen Laura Perera González<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Virología Animal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, CP 32 700, Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** La lengua azul (LA) es una enfermedad viral que afecta a los rumiantes domésticos y salvajes. El agente etiológico de esta enfermedad es el virus de la lengua azul (VLA) que se transmite principalmente por vectores hematófagos del género *Culicoides* y tiene una distribución global. Cuba se encuentra en una zona de circulación endémica del virus y a pesar que desde el año 2007 se reporta a la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA) la presencia de bovinos seroreactores, no existen evidencias de manifestaciones clínicas de la enfermedad ni se ha aislado el virus. El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar el virus de la lengua azul a partir de la sangre de un ternero naturalmente infectado de la provincia Mayabeque en 2018. El virus fue aislado en huevos embrionados de pollo y en cultivo celular a partir de la sangre del ternero a los 21 días de edad que resultó positiva a la presencia de virus por un ensayo de reverso transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa anidada (nRT-PCR). Los embriones inoculados mostraron mortalidad embrionaria, disminución de la talla, coloración rojiza y/o edema como indicativo de multiplicación viral. En el cultivo celular se observaron focos de células redondeadas y refráctiles. La identificación del virus se realizó por los ensayos de nRT-PCR, un Kit comercial de RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) y rRT-PCR basado en SYBR Green-I para la detección específica del VLA.

**Palabras clave:** Virus de la lengua azul, aislamiento, identificación.

**ABSTRACT:** Bluetongue (BT) is a viral disease that affects domestic and wild ruminants. The etiological agent of this disease is bluetongue virus (BTV) which is mostly transmitted by blood-borne vectors of the *Culicoides* genus and has a global distribution. Cuba is located in a zone of endemic circulation of the virus. Although the presence of bovine reactors has been reported to the World Organization for Animal Health (WOAH) since 2007, there is no evidence of clinical manifestations of the disease and the virus has not been isolated. This work aimed to isolate and identify bluetongue virus from the blood of a naturally infected calf from Mayabeque province in 2018. The virus was isolated in chicken embryonated eggs and in cell culture from the blood of the calf at 21 days of age, which tested positive for the presence of virus by a nested reverse transcription polymerase chain reaction assay (nRT-PCR). The inoculated embryos showed embryonic mortality, decreased size, reddish coloration and/or edema as indicative of viral multiplication. In cell culture, rounded and refractile cell foci were observed. Virus identification was performed by nRT-PCR assays, a commercial real-time RT-PCR kit (rRT-PCR) and rRT-PCR based on SYBR Green-I for specific detection of BTV.

**Key words:** Bluetongue virus, isolation, identification.

## INTRODUCCIÓN

La lengua azul (LA) es una enfermedad viral infecciosa, no contagiosa, aguda, transmitida principalmente por vectores que afecta a rumiantes domésticos y salvajes. Se encuentra entre las enfermedades notificables a la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA), debido a su rápida transmisión y su gran poder de difusión. Esta enfermedad es causada por el virus de la lengua azul (VLA), agente etiológico

que pertenece al género *Orbivirus*, familia *Reoviridae* (1). Existe un número en constante crecimiento de serotipos atípicos con diferentes características virales que son genéticamente distintos de los 24 serotipos clásicos, actualmente se definen 36 serotipos de este virus (2). Las dificultades en la serotipificación adecuada de estas nuevas cepas atípicas permitieron su clasificación a nivel molecular como 'putative novel (atypical) serotypes' (3).

\*Autores en igualdad de condiciones.

\*\*Correspondencia a: Carmen Laura Perera González. E-mail- [pereragonzalez@gmail.com](mailto:pereragonzalez@gmail.com)

Recibido: 09/07/2023

Aceptado: 13/07/2023

La identificación tradicional del virus implica su aislamiento y replicación en huevos embrionados de pollo (HEP), cultivos celulares o inoculación en rumiantes susceptibles y la posterior aplicación de pruebas específicas para la detección del virus. En la actualidad, se emplean diversas pruebas de RT-PCR en las que se utilizan diferentes métodos de extracción, transcriptasas inversas, enzimas de amplificación, cebadores y condiciones de ensayo. En el Manual de la OMSA (1) se describen dos pruebas de RT-PCR para la detección del VLA, una prueba de rRT-PCR (4) basada en sondas que tiene como diana el gen NS3 y una prueba de nRT-PCR anidada que tiene por diana el gen NS1, en las que se usan cebadores diseñados por Katz y col. (5). La prueba anidada se ha utilizado con éxito durante más de 20 años y permite detectar los serotipos del 1 al 24 y el 26 (no hay informes de análisis de otros serotipos) de varias especies. También se ha empleado la rRT-PCR (4) en varios países del mundo y se ha observado que permite detectar 27 serotipos del VLA (así como otras cepas del VLA recientemente detectadas).

En Cuba, se han detectado un gran número de animales serológicamente positivos (6) pero no se ha aislado el virus y se desconocen los serotipos circulantes, así como las especies de vectores involucrados en la transmisión del mismo. El hecho que exista evidencia de la circulación del virus hace necesario conocer el o los serotipos que están circulando. Para ello lo primero es realizar el aislamiento viral (AV) del agente para su posterior identificación y caracterización. El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar el virus de la lengua azul a partir de la sangre de un ternero naturalmente infectado de la provincia Mayabeque en 2018.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de muestras por exposición de un ternero a la infección natural con el VLA

Se utilizó un ternero mestizo Holstein recién nacido proveniente del Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, 2018) el cual no ingirió calostro, se alimentó durante los primeros cuatro días con reemplazante lácteo y pasado ese tiempo se sustituyó por leche. El ternero fue liberado a las condiciones naturales bajo control. La temperatura se monitoreó diariamente en el horario de la mañana durante los primeros 30 días de edad.

En el momento del parto, a los 15 y 30 días de nacido del ternero se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante. Se centrifugaron, se colectó el suero y se conservaron a 4°C hasta su utilización para la detección de anticuerpos mediante un ELISA competitivo (Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA, VMRD, Pullman, WA, E.U.A), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las muestras de sangre

con anticoagulante (EDTA 3%) se tomaron dos veces a la semana hasta los 42 días de edad. Estas muestras se procesaron según el protocolo descrito en el Manual de la OMSA (7). Las muestras se conservaron a -80° C hasta su utilización en el ensayo de nRT-PCR.

### Extracción del ARN viral

El ARN viral de la sangre completa fue extraído usando una combinación de dos métodos. Al inicio, el método de TRI Reagent® LS (SIGMA, San Louis, Missouri, E.U.A), de acuerdo con las instrucciones del fabricante hasta que se obtuvo la fase acuosa. Se añadió etanol absoluto a esta fase y a partir de este paso la extracción continuó de acuerdo a las recomendaciones de los proveedores de QIAamp® Mini kit de ARN viral (Qiagen®, GmbH). El ARN fue resuspendido en 60 µL de tampón de elución.

### Síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)

El ADNc se sintetizó con el empleo la reverso transcriptasa M-MLV (Promega, Madison, WI, E.U.A) en un volumen final de reacción de 20 µL de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### Ensayo de nRT-PCR para detección específica del VLA

Para detectar la presencia del VLA se utilizó un nRT-PCR (1) con cebadores que amplifican un fragmento del gen NS1 (segmento 5 codificante para la proteína NS1) altamente conservado del virus. Cebador sentido (A): 5'-GTT-CTC-TAG-TTG-GCAACC-ACC-3' y cebador antisentido (B): 5'-AAG-CCA-GAC-TGT-TTCCCG-AT-3'. Los cebadores del nRT-PCR fueron el cebador sentido (C): 5'-GCAGCA-TTT-TGA-GAG-AGC-GA-3' y el cebador antisentido (D): 5'-CCCGAT-CAT-ACA-TTG-CTT-CCT-3'. La primera reacción amplifica un segmento de 274 pb y en la segunda reacción se amplifica un segmento de 101 pb. Los productos de amplificación se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, en tampón TBE 0.5X pH 8.4 (89mM de Tris; 89mM de Ácido Bórico; 2mM de EDTA) teñidos con bromuro de etidio (0.5 g/mL) y visualizados en un transiluminador bajo luz ultravioleta (UV).

### Aislamiento del VLA en huevos embrionados de pollo

Para realizar el AV se seleccionó una muestra de sangre (procedente del ternero a los 21 días de edad con infección natural, que resultó previamente positivo al VLA mediante nRT-PCR. Brevemente, en un primer pase (1P) se inoculó 0.1 mL de la muestra seleccionada por vía intravenosa a 23 HEP con 12 días de edad, seis embriones se emplearon como contro-

les. Los huevos se incubaron entre 32-33,5°C y se observaron diariamente bajo un ovoscopio. La muerte embrionaria ocurrida en las primeras 24 horas post-inoculación se consideró inespecífica. Los embriones que murieron entre los dos y siete días posteriores a la inoculación, así como los que permanecieron vivos al séptimo día, se homogeneizaron por separado. Se homogeneizaron los embriones completos después de eliminar sus cabezas, u órganos combinados, como el hígado, el corazón, el bazo, los pulmones y los riñones y los restos se eliminaron por centrifugación. En un segundo pase (2P) se emplearon 42 embriones, 36 fueron inoculados con 0.1 mL de los sobrenadantes de los embriones muertos a las 48 h, 96 h y los que continuaron vivos a las 168 h del 1P. Seis embriones se emplearon como controles.

### Aislamiento del VLA en cultivo celular

Las muestras que resultaron positivas al VLA después de dos pases sucesivos en HEP fueron sometidas a aislamiento en cultivo celular.

Se emplearon células de la línea Vero que se sembraron en placas de 24 pozos de manera tal que tuvieran entre un 70-90% de confluencia de la monocapa en el momento de la inoculación. Brevemente, se retiró el medio DMEM de los pocillos sembrados y se añadió 1 mL de medio para lavar cada pozo. Se inocularon 0.2 mL de las diluciones 1/10 y 1/100 de cada muestra en medio que contenía 5% de suero fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina 100 µg/mL de estreptomycin. Se mantuvieron pocillos controles en los que se inocularon 0.2 mL de medio y controles sin inocular. Las placas se colocaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora de absorción. Se adicionó 1 mL de medio y se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante seis días. Las placas se observaron diariamente. Al sexto día se congelaron y descongelaron tres veces y al sobrenadante se le realizaron tres pases sucesivos. Seguidamente el sobrenadante resultante del tercer pase (3P) se conservó a -20°C hasta su posterior evaluación.

### Identificación del VLA

Para identificar la presencia del VLA se utilizó el ensayo de nRT-PCR descrito, un estuche comercial de rRT-PCR (Virotype® BTV Plus, Qiagen Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante y el ensayo de rRT-PCR basado en SYBR Green-I para la detección específica del VLA descrito por Acevedo y col. (8).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Exposición de un ternero a la infección natural con el VLA

En Cuba, la alta prevalencia de anticuerpos al VLA, así como la no presentación de manifestaciones clínicas de la enfermedad, constituyen limitan-

tes para obtener muestras adecuadas que permitan el AV. Por este motivo, la estrategia de este estudio fue exponer un ternero recién nacido a las condiciones del medio natural, para provocarle la infección por el virus, de manera que se pudieran obtener muestras positivas para aislar este agente.

Según lo reportado por Adams y col. (9) y MacLachlan y col. (10) la infección por el VLA en el bovino tiene la característica de cursar de manera subclínica o producir un incremento moderado de la temperatura, considerándose febriles cuando presentan temperaturas por encima de 39.5°C (11).

Al analizar la dinámica de temperatura (Figura 1) se observó que entre los 3-7 días de edad el animal comenzó a manifestar fiebre, lo que pudiera relacionarse con el período de incubación de la enfermedad. Según lo reportado por Schwartz-Cornil y col. (12) este período ocurre frecuentemente entre los 6-10 días y en algunos casos en un tiempo menor. Se plantea que de 3-4 días después aparece la viremia. Desde el punto de vista clínico el ternero sólo manifestó un ligero incremento de la temperatura entre los 8-10 días de nacido lo que pudiera interpretarse como el comienzo de la viremia. Las bandas de amplificación específicas correspondientes a 101 pb, obtenidas mediante el ensayo de nRT-PCR, comienzan a hacerse visibles a partir de los 10 días de edad, lo que demuestra la presencia del VLA (Figura 2). A partir de los 21 días de edad se obtienen bandas fuertes, muy bien definidas que fueron detectadas hasta los 35 días de edad del animal. La intensidad de la banda disminuye posteriormente hasta los 42 días de edad. Si tenemos en cuenta lo reportado por Flannery y col. (13), quienes plantean que entre los 7-12 días después del inicio de la infección aparece un pico de viremia, esto justifica el hecho que a partir de los 21 días de edad sea el momento donde se observen las bandas de amplificación específicas más fuertes y mantenidas (Figura 2). Hasta los 42 días de edad el animal se mantiene virémico, este resultado se corresponde con lo reportado por Schwartz-Cornil y col. (12) quienes plantean que el VLA puede ser detectado en sangre durante 35 a 60 días, mientras que partículas virales, hasta 160 días post infección.

Las respuestas serológicas aparecen entre los 7-14 días después de la infección por el VLA (1). Después de la evaluación de las muestras de suero mediante el ensayo de ELISA competitivo (Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA, VMRD, Pullman, WA, E.U.A) se reveló que a los 30 días de edad se produjo seroconversión.

Este resultado unido a los obtenidos en el nRT-PCR, nos permiten aseverar que el pico febril se corresponde con el inicio de la viremia en el animal a consecuencia de una infección por el VLA y que se dispone

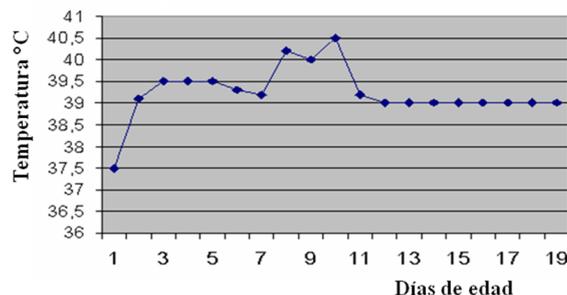


Figura 1. Dinámica de la temperatura del ternero. / *Calf temperature dynamics.*

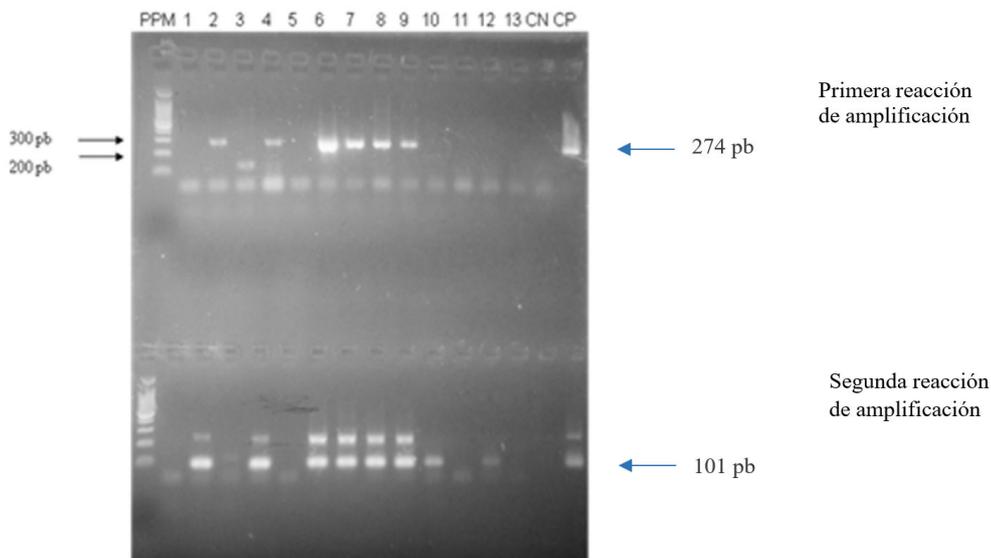


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del producto del RT-PCR de diferentes muestras del ternero. PPM: Patrón de peso molecular de 100 pb (Promega); Líneas 1: 7 días de edad; 2: 10 días edad; 3: 11 días edad; 4: 14 días edad; 5: 17 días; 6: 21 días edad; 7: 24 días; 8: 28 días edad; 9: 31 días edad; 10: 35 días edad; 11: 40 días edad; 12: 42 días edad; 13: CN: Control negativo; CP: Control positivo (BTV-4). / *Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product from different calf samples. PPM: 100 bp molecular weight marker (Promega); Lines 1: 7 days old; 2: 10 days old; 3: 11 days old; 4: 14 days old; 5: 17 days old; 6: 21 days old; 7: 24 days old; 8: 28 days old; 9: 31 days old; 10: 35 days old; 11: 40 days old; 12: 42 days old; 13: NC: Negative control; PC: Positive control (BTV-4).*

de muestras adecuadas para intentar el aislamiento de este agente viral.

### Aislamiento e identificación del VLA en huevos embrionados de pollo y en cultivo celular

Según lo que se establece en el Manual de la OMSA (2021) (1), para lograr una mejor eficiencia en el aislamiento del VLA, se debe realizar el aislamiento primario en HEP y posteriormente realizar pases en cultivo celular, esto permite una mayor replicación del virus (OMSA, 2021). En un estudio comparativo de los dos sistemas de aislamiento HEP y varias líneas celulares realizados por Bumarov y col. (14) demostraron que a pesar que ambos sistemas fueron efectivos, lograron mejores resultados cuando realizaron el aislamiento primero en HEP y más tarde inocularon las muestras con alteraciones específicas en cultivos celulares. Este mismo procedimiento fue realizado por Karam y col. (15) con resultados similares.

Para intentar el aislamiento del VLA, en un inicio solo se realizó un 1P en HEP, inoculando una muestra positiva procedente de la infección natural del ternero (correspondiente a los 21 días de edad). A este tiempo se obtuvo una banda fuerte y bien definida en el ensayo del nRT-PCR (Figura 2). Posteriormente se realizó un 2P en HEP. Los resultados obtenidos revelaron mortalidad embrionaria, lo que era un indicativo de multiplicación viral. En la Tabla 1 se muestra la mortalidad diaria después de realizar un 1P en HEP. La muerte embrionaria ocurrida en las primeras 24 h post-inoculación se consideró inespecífica. Solo se observó mortalidad a las 48 y 96 h post-inoculación, el resto de los embriones permanecieron vivos hasta las 168 h post-inoculación. En la Tabla 2 se muestra la mortalidad diaria después de realizar un 2P en HEP. Solo se observó mortalidad específica a las 48 h y 168 h post-inoculación en la muestra proveniente de

las 48h 1P, el resto de los embriones permanecieron vivos hasta las 168 h post-inoculación.

En los embriones inoculados, además de la mortalidad, se observaron lesiones compatibles a las producidas por el VLA que incluyeron presencia de embriones con disminución de tamaño, coloración rojiza debido a múltiples hemorragias y edema asociado (7, 16) (Figuras 3- 6).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Clavijo y col. (2000) quienes plantean que durante el aislamiento del VLA el patrón de mortalidad embrionaria es característico y usualmente los embriones mueren entre los dos y seis días post inoculación mostrando una coloración rojo cereza debido a las hemorragias y los edemas que se producen (17).

A través del ensayo de nRT-PCR se logró la identificación del virus (Figura 7). Se obtuvieron reacciones de amplificación específicas de la talla esperada (101 pb) para los cebadores utilizados. Este ensayo propuesto en el Manual de la OMSA se ha empleado por diferentes autores quienes lo describen como una herramienta muy útil en la confirmación del VLA (1).

Para verificar los resultados obtenidos se empleó además, el Kit comercial de rRT-PCR (Virotype® BTV Plus, Qiagen Germany) y el ensayo de rRT-PCR basado en SYBR Green-I para la detección específica del VLA descrito por Acevedo y col. (8). Al evaluar las muestras por estos ensayos se reveló coincidencia con los resultados obtenidos con el nRT-PCR (Tabla 3). A las 48 y 96 h post-inoculación después de un 1P en HEP no se detectó el VLA por ninguno de los ensayos evaluados. A las 168 h post-inoculación se obtuvieron resultados positivos por los tres ensayos con un incremento en los valores de Ct lo que es un indicativo que se produjo un incremento de la multiplicación viral (Figuras 3- 6).

Según lo descrito por Wechsler y Luedke (18) existen diferentes cultivos que son susceptibles para la multiplicación del VLA, entre ellos se encuentran las células L de ratón, las células de *Aedes albopictus*,



**Figura 3.** Embriones de pollo (primer pase) evaluados a las 168 h post-inoculación. A: Control no inoculado, B: Embrión de pollo inoculado con muestra positiva procedente de la infección natural de un ternero. / *Chicken embryos (first passage) evaluated at 168 h post-inoculation. A: Non-inoculated control, B: Chicken embryo inoculated with a positive sample from the natural infection of a calf.*

las células BHK-21 o las células Vero. Las células BHK-21 y las Vero son las más frecuentemente utilizadas en los laboratorios de diagnóstico. Estas últimas fueron las seleccionadas en el estudio realizado debido a que tienen la capacidad de soportar la replicación del VLA y a diferencia de otras, como las BHK-21, son más tolerantes a la sobrepoblación. Esto hace que estas células sean las más adecuadas para ensayos a largo plazo, aunque son más lentas para demostrar un ECP inducido por el virus (18, 19).

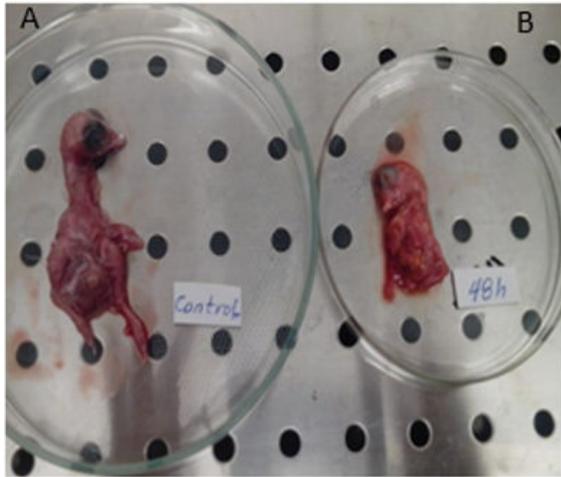
Después de realizar un 3P en células Vero se observó, en algunos pocillos, focos de células redondeadas y refráctiles al quinto día post inoculación. En el resto de los pases no hubo un ECP característico. La evaluación de los sobrenadantes de cada pocillo con ECP se realizó mediante los tres ensayos anteriormente mencionados. La Tabla 4 muestra que hubo coincidencia entre ambos ensayos empleados, revelándose que to-

**Tabla 1.** Embriones vivos y muertos después de 1P en huevos embrionados de pollo. / *Live and dead embryos after 1P in chicken embryonated eggs.*

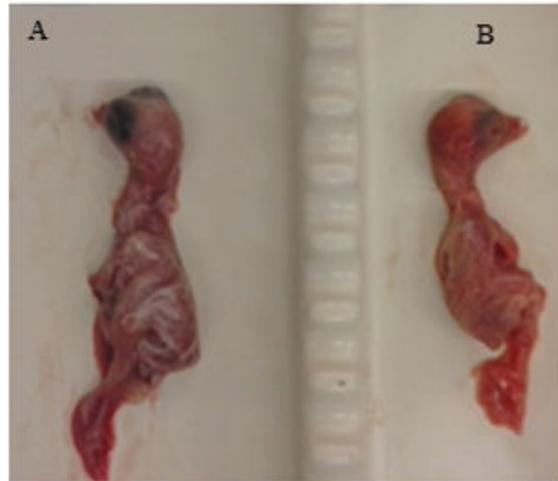
| Embriones        | Horas post-inoculación |      |      |      |       |       |       |
|------------------|------------------------|------|------|------|-------|-------|-------|
|                  | 24 h                   | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h | 144 h | 168 h |
| Total de muertos | 10                     | 1    | 0    | 1    | 0     | 0     | 0     |
| Total de vivos   | 13                     | 12   | 12   | 11   | 11    | 11    | 11    |

**Tabla 2.** Embriones vivos y muertos después de 2P en huevos embrionados de pollo. / *Live and dead embryos after 2P in chicken embryonated eggs.*

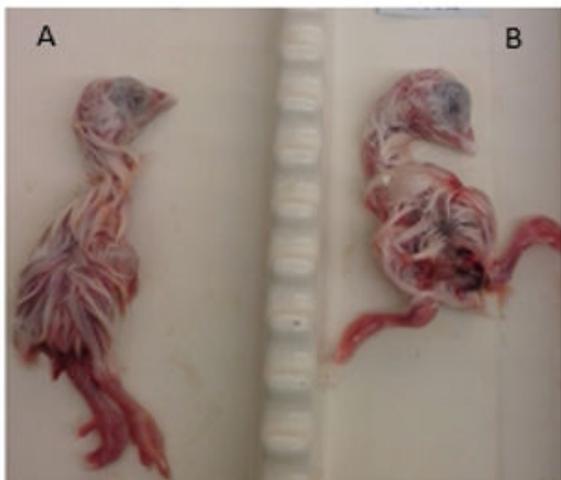
| Embriones        | Horas post inoculación |     |     |     |      |      |      |
|------------------|------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|
|                  | 24h                    | 48h | 72h | 96h | 120h | 144h | 168h |
| 48h 1P           | 4                      | 2   | 0   | 0   | 0    | 0    | 1    |
| 96h 1P           | 12                     | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    |
| 168h 1P          | 12                     | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    |
| Total de muertos | 28                     | 2   | 0   | 0   | 0    | 0    | 1    |
| Total de vivos   | 8                      | 6   | 6   | 6   | 6    | 6    | 5    |



**Figura 4.** Embriones de pollo (segundo pase) evaluados a las 48 h post-inoculación. A: Control no inoculado, B: Embrión de pollo inoculado con muestra positiva procedente de la infección natural de un ternero. / *Chicken embryos (second passage) evaluated at 48 h post-inoculation. A: Non-inoculated control, B: Chicken embryo inoculated with a positive sample from the natural infection of a calf.*



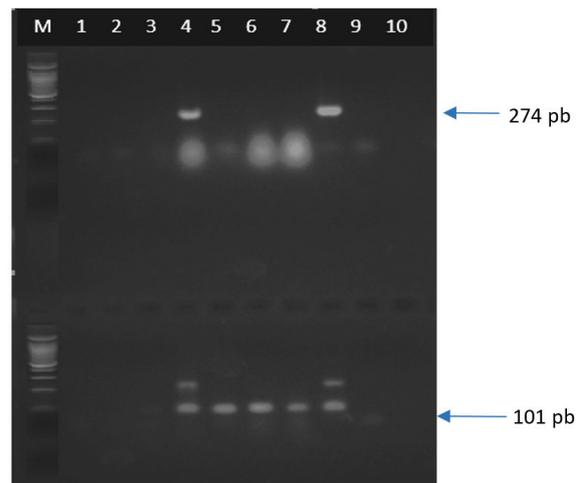
**Figura 5.** Embriones de pollo vivos (segundo pase) evaluados a las 168 h post-inoculación. A: Control no inoculado, B: Embrión de pollo inoculado con muestra positiva procedente de la infección natural de un ternero. / *Live chicken embryos (second passage) evaluated at 168 h post-inoculation. A: Non-inoculated control, B: Chicken embryo inoculated with a positive sample from the natural infection of a calf.*



**Figura 6.** Embriones de pollo muertos (segundo pase) evaluados a las 168 h post-inoculación. A: Control no inoculado, B: Embrión de pollo inoculado con muestra positiva procedente de la infección natural de un ternero. / *Dead chicken embryos (second passage) evaluated at 168 h post-inoculation. A: Non-inoculated control, B: Chicken embryo inoculated with a positive sample from the natural infection of a calf.*

dos los sobrenadantes de los pocillos evaluados fueron positivos al VLA. Se observó un incremento de los valores de Ct en aquellas muestras que provenían de un 2P en HEP y tenían más tiempo post-inoculación lo que se corresponde con un incremento de la multiplicación viral. En el nRT-PCR se obtuvieron bandas de la talla esperada en todas las muestras evaluadas (Figura 8).

Resultados similares en cuanto al ECP fueron reportados por Bhat y col. en el 2018 (20). Estos autores inocularon una cepa del VLA pero en la línea celular BHK-21 y observaron el ECP entre las 48-72 horas



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa (2%) del nRT-PCR para la detección del VLA a partir de pases realizados en embrión de pollo. M: Marcador de Peso molecular de 100 pb (Promega), Líneas: 1: Control negativo de extracción; 2: 48 h 1P; 3: 96 h 1P; 4: 168 h 1P; 5: 48 h 2P; 6: 168 h 2P vivos; 7: 168 h 2P muertos; 8: Control positivo de amplificación (cepa vacunal VLA); 9-10: Control negativo de amplificación (agua libre de nucleasas). / *Agarose gel electrophoresis (2%) of the nRT-PCR for the detection of BTV from chicken embryo passages. M: 100 bp molecular weight marker (Promega), Lanes: 1: Negative extraction control; 2:48h 1P; 3:96h 1P; 4:168h 1P; 5:48h 2P; 6: 168 h 2P alive; 7:168 2P dead; 8: Positive amplification control (VLA vaccine strain); 9-10: Negative amplification control (nuclease-free water).*

después de la infección. El ECP más característico fue la retracción y redondeamiento celular. Además, al evaluar los diferentes pases de cultivo por un ensayo de rRT-PCR encontraron un incremento de la multiplicación viral directamente proporcional con los

**Tabla 3.** Resultados de la evaluación del 1P y 2P en huevos embrionados de pollo mediante el Kit comercial de rRT-PCR (Virotype® BTV Plus, Qiagen Germany), el ensayo de rRT-PCR basado en SYBR Green-I (Acevedo *et al.*, 2016) y el nRT-PCR. / Results of 1P and 2P evaluation in chicken embryonated eggs using the commercial rRT-PCR Kit (Virotype® BTV Plus, Qiagen Germany), rRT-PCR based on SYBR Green-I (Acevedo *et al.*, 2016) and nRT-PCR.

| Embriones con alteraciones | Valores de Ct (Virotype® BTV Plus) | Valores de Ct (rRT-PCR basado en SYBR Green-I, Acevedo <i>et al.</i> , 2016) | nRT-PCR  |
|----------------------------|------------------------------------|--|----------|
| 48 h 1P                    | -                                  | -  | NEGATIVA |
| 96 h 1P                    | -                                  | -  | NEGATIVA |
| 168 h 1P                   | 20.69                              | 26.63  | POSITIVA |
| 48 h 2P                    | 21.58                              | 25.59  | POSITIVA |
| 168 h 2P vivos             | 21.50                              | 25.53  | POSITIVA |

**Tabla 4.** Resultados de la evaluación del 3P en células Vero (procedentes de 1P y 2P en huevos embrionados de pollo) mediante el Kit comercial de rRT-PCR (Virotype® BTV Plus, Qiagen Germany), el ensayo de rRT-PCR basado en SYBR Green-I (Acevedo y col. 2016) y el nRT-PCR. / Results of 3P evaluation in Vero cells (from 1P and 2P in chicken embryonated eggs) using the commercial rRT-PCR Kit (Virotype® BTV Plus, Qiagen Germany), -based rRT-PCR based on SYBR Green-I assay (Acevedo *et al.*, 2016) and nRT-PCR.

| Pocillo con efecto citopático | Valores de Ct (Virotype® BTV Plus) | Valores de Ct (rRT-PCR basado en SYBR Green-I, Acevedo <i>et al.</i> , 2016) | nRT-PCR  |
|-------------------------------|------------------------------------|--|----------|
| 168 h 1P 1:10-2               | 23.50                              | 28.54  | POSITIVA |
| 168 h 1P 1:100-2              | 24.86                              | 29.52  | POSITIVA |
| 48 h 1P 1:10-3                | 21.53                              | 26.32  | POSITIVA |
| 48 h 2P 1:100-2               | 20.69                              | 25.67  | POSITIVA |
| 48 h 2P 1:100-3               | 20.55                              | 25.50  | POSITIVA |
| 168 h 2P 1:10-2               | 18.03                              | 23.55  | POSITIVA |
| 168 h 2P 1:10-3               | 19.85                              | 24.54  | POSITIVA |

diferentes pases realizados. Los resultados obtenidos muestran la utilidad de ambos sistemas utilizados, los embriones de pollo de 11 días de desarrollo y la línea celular VERO para realizar el aislamiento del VLA.

## CONCLUSIONES

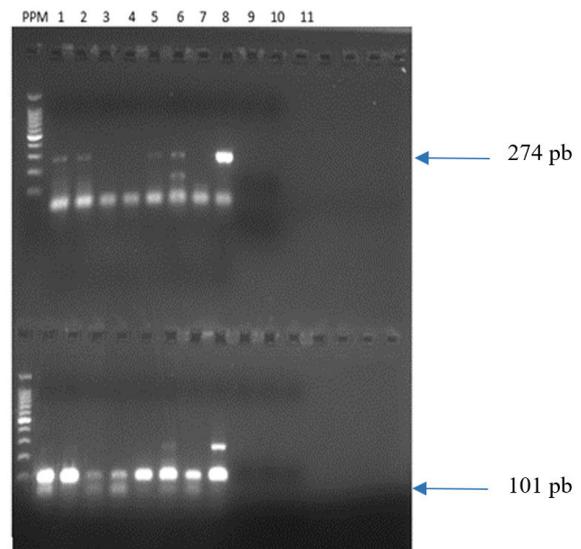
El VLA se detectó en muestras de sangre de un ternero naturalmente infectado a partir de los 21 días de edad y se aisló e identificó en embrión de pollo y en cultivo celular con el empleo de ensayos de detección de ácidos nucleicos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen a todo el personal de las unidades donde se realizaron los muestreos, así como a las autoridades de la Dirección de Salud Animal de la provincia de Mayabeque. A Nelson Albelo Chávez quien se encargó de la colección de las muestras de sangre y de la atención del ternero.

## REFERENCIAS

- OMSA (2021): Capítulo 3.1.3 Lengua Azul (Infección por el virus de la lengua azul). En: Manual Terrestre de la OIE 2021. pp 1-21.
- Ries C, Vöggtlin A, Hüßy D, Jandt T, Gobet H, Hilbe M, et. al). Putative Novel Atypical BTV Serotype ‘36’ Identified in Small Ruminants in Switzerland. Viruses 2021, 13, 721. <https://doi.org/10.3390/v13050721> <https://www.mdpi.com/journal/viruses>.



**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa (2%) del nRT-PCR para la detección del VLA a partir de pases realizados en cultivo de células Vero. PPM: Marcador de Peso molecular de 100 pb (Promega), Líneas: 1:168h 1P (3P) 1:10\_2; 2:168h 1P (3P) 1:100\_2, 3:48h 2P (3P) 1:10\_3, 4: 48h 2P (3P) 1:100\_2; 5:48h 2P (3P) 1:100\_3, 6: 168h 2P (3P) 1:10\_2, 7: 168h 2P (3P) 1:100\_3; 8: Control positivo de amplificación (cepa vacunal VLA); 9: Control negativo de extracción, 10: Control negativo de amplificación (agua libre de nucleasas), 11: control negativo de la segunda reacción de amplificación. / Agarose gel electrophoresis (2%) of the nRT-PCR for the detection of BTV from passages carried out in Vero cell culture. PPM: 100 bp molecular weight marker (Promega), Lines: 1:168h 1P (3P) 1:10\_2; 2:168h 1P (3P) 1:100\_2, 3:48h 2P (3P) 1:10\_3, 4:48h 2P (3P) 1:100\_2; 5:48h 2P (3P) 1:100\_3, 6:168h 2P (3P) 1:10\_2, 7:168h 2P (3P) 1:100\_3; 8: Positive amplification control (VLA vaccine strain); 9: Negative extraction control, 10: Negative amplification control (nuclease-free water), 11: Negative control of the second amplification reaction.

3. Ries C, Sharav T, Tseren-Ochir EO, Beer M, Hoffmann B. Putative Novel Serotypes '33' and '35' in Clinically Healthy Small Ruminants in Mongolia Expand the Group of Atypical BTV. *Viruses* 2020, 13, 42. [CrossRef] [PubMed].
4. Hofmann, M., Griot, C., Chaignat, V., Perler, L., y Thür, B. (2008). Bluetongue disease reaches Switzerland. *Schweizer. Archiv. Tierheilkunde*, 150, 49-56. doi:10.1024/0036-7281.150.2.49.
5. Katz J, Gustafson G, Alstad D, Adler K, Moser K. Colorimetric diagnosis of prolonged bluetongue viremia in sheep using an enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acids. *Am. J. Vet. Res* [en línea] janeiro 1993 [Citado 20 janeiro 2020]; 54: 2021-2026. Disponible en: pmid:8116932.
6. Martínez N, Alfonso A, Barrera M. Primer reporte de bovinos seroreactores al virus de la lengua azul en Cuba. *Rev. Salud Anim.* 2011; 33 (2): 131-133.
7. OMSA (2017). World Organisation for Animal Health. Capítulo 2.1.3. Lengua azul (Infección por el virus de la lengua azul) (NB: Versión adoptada en mayo de 2014) en Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/E\\_summry-02-02-2018.htm](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/E_summry-02-02-2018.htm).
8. Acevedo AM, Vega A, Hinojosa Y, Lazo AM, Relova D, Coronado L, Frías MT, Perera Carmen L. Standarization of a SYBR Green-I based real-time RT-PCR assay for detection of bluetongue virus in centinel animals *Rev. Salud Anim.* 2016, 38 (1): 46-51 ISSN: 2224-4700.
9. Adam IA, Abdalla MA, Mohamed EH, Aradaib IE. Prevalence of bluetongue virus infection and associated risk factors among cattle in North Kordufan State, Western Sudan. *BMC Veterinary Research.* 2014; 10: 94.
10. Maclachlan, N. J., C. P. Drew, K. E. Darpel y G. Worwa (2009): The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Pathol.* 141(1): 1-16.
11. Afshar A, Thomas FC, Wright PF, Shapiro JL, Shettigara P, Anderson J. Comparison of Competitive and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Bluetongue Virus Antibodies in Serum and Whole Blood. *J. of Clinical Microbiology.* 1987; 25 (9): 1705-1710.
12. Schwartz-cornil I, Mertens P, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Bréard E, Mellor P, Maclachlan N, Zientara S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary research* [en línea] janeiro 2008 [Citado 10 fevereiro 2020]; 39: 46. Disponible en: doi:10.1051/vetres:2008023.
13. Flannery J, Rajko-nenow P, Hicks H, Hill H, Gubbins D, Batten C. Evaluating the most appropriate pooling ratio for EDTA blood samples to detect Bluetongue virus using real-time RT-PCR. *Veterinary Microbiology.* 2018; 217: 58-63.
14. Bumbarov V, Golender N, Erster O, Khinich Y. Detection and isolation of Bluetongue virus from commercial vaccine batches. *Vaccine* [en línea] junho 2016 [Citado 20 janeiro 2020]; 34 (28): 3317-23. Disponible en: doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.097.
15. Karam Chand, Sanchay K. Biswas, Bimalendu Mondal. Isolation and Characterization of Bluetongue Virus Recovered from Blood Samples by Immunoaffinity Purification. *Indian J Microbiol.* 2018 58(4): 433-439. doi: 10.1007/s12088-018-0735-z.
16. Henrich M, Reinacher M, Hamann H. Lethal bluetongue virus infection in an alpaca. *Vet Rec* [en línea] janeiro 2007 [Citado 13 janeiro 2020]; 161: 764. Disponible en: doi: 10.1136/vr.061.22.764. Clavijo A, Heckert R, Dulac G, Afshar A. Isolation and identification of bluetongue virus. *J Virol.* 2000; 87: 13-23.
17. Clavijo, A., Heckert, R., Dulac, G., Afshar, A. Isolation and identification of bluetongue virus. *J Virol.* 2000; 87:13-23.
18. Wechsler SJ, Luedke AJ. Detection of bluetongue virus by using bovine endothelial cells and embryonated chicken eggs. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(1): 212-214. doi: 10.1128/jcm.29.1.212-214.1991.
19. Wechsler S, Mcholland L, Tabachnick W. Cell lines from *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) support replication of bluetongue virus. *J. Invert. Pathol.* 1989; 54: 385-393.
20. Bhat S, Khorajiya J, Malla B, Dar P, Singh K, Nandi S, Shah M. Detection and Quantification of Bluetongue Virus Serotype 23 by Evagreen Based Real Time PCR. *International Journal of Livestock Research* [en línea] janeiro 2018 [Citado 20 janeiro 2020]; 8 (6): 312-321. Disponible en: doi: 10.5455/ijlr.20171012092449.

**Conflicto de intereses.** Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

**Contribución de los autores.** Ana María Acevedo Beiras: **Investigación. Conceptualización. Curación de datos. Análisis formal. Redacción. Escritura-borrador original.** Maray Curiel Hernández: **Investigación. Conceptualización. Curación de datos. Análisis formal.** Cristian Díaz Corona: **Investigación, Curación de datos.** Yalainne Obret Ferrer: **Investigación. Curación de datos.** María Teresa Frías Lepoureau: **Investigación. Conceptualización.** Carmen Laura Perera González: **Investigación; Administración de Proyecto, Conceptualización; Supervisión; Redacción: revisión y edición. Todos los autores participaron en la discusión de los resultados, leyeron, revisaron y aprobaron el texto final.**

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/)