CENSA
CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA

ARTÍCULO ORIGINAL

Revista de Salud Animal
Vol. 47, enero-diciembre 2025
ISSN: 2224-4700, ISSN-L: 0253-570X
Cu-ID: https://cu-id.com/2248/v47e18

ENSAYO DE RT-PCR EN TIEMPO REAL BASADO EN SYBR GREEN I PARA LA DETECCIÓN DE CORONAVIRUS BOVINO

SYBR Green I-based real time RT-PCR assay for bovine coronavirus detection

Carmen Laura Perera González*, Ana María Acevedo Beiras, Liani Coronado Báez, Maray Curiel Hernández, Cristian Díaz-Corona, Yalainne Obret Ferrer, Gisselle Chavez Rodríguez

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

RESUMEN: El coronavirus bovino (BCoV) está asociado a tres síndromes clínicos diferentes: síndrome diarreico neonatal del ternero, la disentería de invierno que provoca enteritis hemorrágica en bovinos adultos y el síndrome respiratorio asociado con la fiebre de embarque, todos con un impacto negativo en el bienestar animal y significativas pérdidas económicas en las industrias cárnica y lechera. El diagnóstico de laboratorio de infecciones causadas por virus se basa fundamentalmente en métodos serológicos y moleculares. El objetivo de este estudio fue desarrollar un ensayo de PCR en tiempo real basado en SYBR Green I para la detección de BCoV, mediante la amplificación de un fragmento del gen de la nucleocápsida viral. Se optimizaron los parámetros de los componentes críticos de la reacción de PCR y las condiciones termodinámicas. El análisis de la curva de disociación confirmó la especificidad de las curvas de amplificación (Tm = 85ºC ± 1°C) sin evidencias de amplificaciones inespecíficas. El ensayo mostró altos niveles de especificidad, repetibilidad y sensibilidad, con un límite de detección de $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/mL. La sensibilidad diagnóstica se evaluó en muestras fecales de animales con síntomas clínicos compatibles con disentería de invierno y en animales sin sintomatología clínica de proceso entérico. El nuevo ensayo resultó más sensible que el ensayo de RT-PCR en punto final y el aislamiento viral para el diagnóstico de BCoV.

Palabras clave: coronavirus bovino, BCoV, rRT-PCR, RT-PCR, SYBR Green I.

ABSTRACT: Bovine coronavirus (BCoV) is associated with three different clinical syndromes: neonatal calf diarrhea syndrome, winter dysentery causing hemorrhagic enteritis in adult cattle, and respiratory syndrome associated with shipping fever; all of which have a negative impact on animal welfare and cause significant economic losses in the meat and dairy industries. Virological laboratory diagnosis relies primarily on serological and molecular methods. This study aimed to develop a SYBR Green I-based real-time PCR assay for BCoV detection by amplifying a fragment of the viral nucleocapsid gene. Parameters of critical PCR reaction components and thermodynamic conditions were optimized. Dissociation curve analysis confirmed the specificity of the amplification curves (Tm = 85ºC ± 1°C) with no evidence of non-specific amplifications. The assay showed high levels of specificity, repeatability and sensitivity, with a detection limit of $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/mL. Diagnostic sensitivity was evaluated in fecal samples from animals with clinical symptoms compatible with winter dysentery and from animals without clinical symptoms of enteric disease. The new assay proved to be more sensitive than end-point RT-PCR and viral isolation for BCoV diagnosis.

Key words: bovine coronavirus, BCoV, rRT-PCR, RT-PCR, SYBR Green I.

INTRODUCCIÓN

Garantizar la seguridad alimentaria es una de las principales metas de los servicios veterinarios, lo cual requiere un control eficaz de las enfermedades infecciosas, especialmente aquellas que provocan pérdidas significativas en especies animales de interés económico (1). Este control depende, en gran medida, de la capacidad para realizar un diagnóstico rápido y confiable de los agentes etiológicos involucrados en los brotes infecciosos (2).

En Cuba, las especies pertenecientes a la subfamilia *Bovinae* tienen un alto valor económico, por lo que la ganadería bovina constituye una prioridad estratégica, al representar uno de los principales patrimonios del país y la segunda rama de importancia económica nacional.

*Autor para la correspondencia: Carmen Laura Perera González. E-mail-pereragonzalezc@gmail.com
Recibido: 19/01/2026
Aceptado: 02/02/2026
Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.
Contribución de los autores: Carmen Laura Perera González: Conceptualización, Curación de datos, Análisis Formal, Investigación, Administración del proyecto, Revisión y edición. **Ana María Acevedo Beiras**: Conceptualización, Curación de datos, Análisis Formal, Investigación, Redacción del borrador original, Revisión y edición. **Liani Coronado Báez:** Conceptualización, Curación de datos, Análisis Formal, Investigación. **Maray Curiel Hernández**: Curación de datos, Análisis Formal, Investigación. **Cristian Díaz-Corona**: Curación de datos, Análisis Formal. **Yalainne Obret Ferrer**: Curación de datos, Análisis Formal. **Gisselle Chavez Rodríguez:** Curación de datos, Análisis Formal. Todos los autores participaron en la discusión de los resultados, leyeron, revisaron y aprobaron el documento final.

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).
https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

La eficiencia productiva del sector bovino se ve comprometida por enfermedades reconocidas a nivel mundial, por su impacto negativo en los bioindicadores productivos de estas especies, algunas de ellas de elevada gravedad (3). Entre estas se encuentra la causada por el género *Betacoronavirus,* al cual pertenece el coronavirus bovino (BCoV), un agente que infecta el tracto respiratorio y gastrointestinal del ganado bovino (4), así como de algunos rumiantes silvestres (5). El BCoV se asocia con diversos síndromes clínicos, como la diarrea en terneros, la disentería de invierno, caracterizada por diarreas hemorrágicas en adultos y enfermedades respiratorias en animales de distintas edades, incluyendo la fiebre de embarque (6). Aunque la mortalidad asociada al virus suele ser baja, la infección por BCoV induce una dramática reducción en la producción de leche en los rebaños lecheros y un deterioro de las condiciones de salud del animal, tanto en terneros como en el bovino adulto (7). Las pérdidas económicas derivadas de la infección por BCoV no se limitan a la mortalidad, sino que también incluyen los costos asociados a servicios veterinarios, tratamientos y medicamentos (8).

La disentería de invierno, considerada una enfermedad exótica y de baja probabilidad de aparición en Cuba por su asociación con climas templados (9), se identificó por primera vez en el país en 2004, mediante RT-PCR en punto final, a partir de muestras fecales de vacas lecheras que padecieron la enfermedad (10). Desde entonces, se han descrito en Cuba brotes estacionales de esta enfermedad (11).

Para reducir el riesgo de diseminación del BCoV y aplicar medidas de control más eficaces, es fundamental contar con ensayos de diagnósticos rápidos y sensibles (12). La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rPCR) permite la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos con elevada sensibilidad y especificidad. En comparación con la PCR convencional o de punto final esta técnica ofrece un mayor rango dinámico, menor riesgo de contaminación cruzada y cuantificación precisa de la carga viral (13). Estas ventajas han posicionado a la rPCR o rRT-PCR, según sea el caso, como la herramienta de elección para el diagnóstico de primera línea. No obstante, en Cuba aún no se dispone de un ensayo diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad para la detección de BCoV, a pesar de ser ampliamente recomendado por numerosos autores para la confirmación de casos clínicos (14).

El objetivo de este estudio fue desarrollar un ensayo de rRT-PCR basado en SYBR Green I para la detección sensible y específica de BCoV.

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 de BCoV, se cultivaron en la línea celular de riñón bovino (MDBK, de las siglas en inglés *Madin Darby Bovine Kidney*) según los procedimientos estándares que se describen en el Manual de Ensayos de Diagnósticos y Vacunas para Animales Terrestres (12). Luego de 72 horas de incubación a 37ºC, los virus se colectaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación y se conservaron a -70ºC hasta ser usados para la extracción del ARN viral.

Procesamiento de las muestras

En este estudio se emplearon muestras de heces de bovinos negativas a BCoV y se contaminaron con la cepa de referencia Kakegawa. El procesamiento de las muestras se realizó de la siguiente forma: se tomó 1 g de la muestra de heces y se diluyó en 9 mL de medio DMEM (Dulbecco´s Modidied Eagle Medium) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se homogenizaron por agitación en vórtex durante 1 min. Estas suspensiones se centrifugaron a 12 000 g x 15 min, a 4ºC. El sobrenadante colectado se filtró por una membrana de celulosa de 0,45 µm.

Métodos de extracción de ARN

La extracción de ARN a partir de las heces contaminadas se realizó por el método propuesto por Casas *et al*. (15). El precipitado obtenido se resuspendió en 10 µL de agua libre de nucleasas (Promega, Madison, WI, USA) y se conservó a -80oC hasta su evaluación.

Selección de cebadores

Se utilizaron los cebadores descritos por Tsunemitsu *et al.* (16) para la detección de BCoV (cebador sentido: 5´-GCCGATCAGTCCGACCAATC-3´ y cebador anti-sentido: 5´-AGAATGTCAGCCGGGGTAT-3´), que amplifican un fragmento de 407 pb del gen de la nucleocápsida viral (16). La Tm del producto de amplificación se estimó con el empleo del paquete de programas Oligo, versión 7 (Análisis Molecular de Biología, Inc., USA).

RT-PCR en tiempo real

Todos los análisis de rRT-PCR se realizaron sobre el instrumento LightCycler® 2.0 (Roche AppliedScience, Mannheim, Germany). Se realizaron un grupo de experimentos para optimizar los protocolos que incluyeron concentraciones de reactivos y parámetros del termoperfil. La reacción de amplificación se realizó en un capilar de vidrio de 20 µL que contenía: 5 µL del ADN molde, 1 µL de cada uno de los cebadores sentido y anti-sentido para los cuales se evaluaron las siguientes concentraciones: 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 µM; 2 µL de LightCycler® FastStart DNA master SYBR-Green I (10X) (Roche, Alemania),

Tabla 1. Cepas de referencia y aislados de campo utilizados en este estudio. / *Reference strains and field isolates used in this study*.

Virus	Cepa de referencia/ Aislado viral	Fuente
BCoV	Kakegawa/ cepa	Instituto Pasteur, Sao Paulo, Brasil.
Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1)	E8/ aislado cubano	CENSA, Cuba
Virus de la diarrea viral bovina (BVDV)	NADL	CENSA, Cuba
Rotavirus bovino	G6	Instituto de Investigaciones Agrícolas de Venezuela
Virus de la bronquitis infecciosa aviar	M43/ aislado cubano	CENSA, Cuba

8 µL de $MgCl_2$ para lo cual se evaluaron las siguientes concentraciones: 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 y 5,5 mM y agua libre de nucleasa (Promega, Madison, WI, USA) para un volumen final de 20 µL en cada reacción. Adicional a esta mezcla se añadió 0,5 µL de la enzima reverso-transcriptasa SuperScript (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

El termoperfil empleado fue el siguiente: 50ºC por 30 min, 95ºC por 10 min seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95ºC por 10 s; se evaluaron tres temperaturas de alineamiento: 58, 60 y 62ºC por 10 s y elongación a 72ºC por 20 s con adquisición de dato fluorescente. Después de los ciclos de PCR, se generó una curva de disociación (0 s a 95ºC, 15 s a 65ºC, 0 s a 95ºC) 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 Applied Science, Mannheim, Germany). El valor de Tm 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 muestras fecales negativas con la cepa Kakegawa de BCoV con título infectivo de $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/mL. De cada dilución se extrajo el ARN viral que se empleó como molde para el ensayo de rRT-PCR. Cada dilución se evaluó por duplicado.

Se utilizaron las condiciones óptimas determinadas en los análisis anteriores.

Especificidad analítica

Para la determinación de la especificidad analítica del ensayo se evaluaron ácidos nucleicos moldes provenientes de diferentes virus que causan un cuadro clínico similar al BCoV: herpesvirus bovino 1 (BoHV-1), rotavirus bovino, virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y otro virus relacionado estrechamente: el virus de la bronquitis infecciosa aviar (Tabla 1).

Repetibilidad

La repetibilidad del ensayo de rRT-PCR basado en SYBR Green I se determinó con el empleo de tres muestras, una muestra positiva fuerte (10^5 $TCID_{50}$/mL), una muestra positiva media (10^3 $TCID_{50}$/mL) y una muestra positiva baja (10^2 $TCID_{50}$/mL). Las tres muestras se obtuvieron diluyendo la cepa Kakegawa de BCoV en sobrenadante de heces negativas a este virus. Para determinar la variabilidad intra-ensayo, cada dilución se evaluó por triplicado. Para medir la variabilidad inter-ensayo, cada dilución se evaluó en tres corridas diferentes realizadas por tres operadores diferentes en días diferentes. La desviación estándar (SD, de las siglas en inglés, *standard deviations*) se calculó con el programa LightCycler® 4.05.415 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) y el coeficiente de variación (CV) se determinó según la fórmula: CV = (SD [valor de Ct] / Media [valor de Ct]) x 100, de acuerdo con las guías consultadas (USA, Environmental Protection Agency, 2004).

Evaluación del desempeño diagnóstico del ensayo de rRT-PCR en muestras fecales

Las muestras evaluadas procedían de cuatro provincias del país, obtenidas de bovinos de zonas afectadas por la enfermedad (Tabla 2). Las muestras se colectaron entre los meses de septiembre y octubre de 2020, para su posterior procesamiento. Además, se colectaron ocho muestras de una Vaquería Experimental, de animales que no presentaban diarreas. En total se colectaron 35 muestras fecales.

Colecta y procesamiento de las muestras fecales

Las muestras fecales se colectaron en tubos estériles después de limpiar el área con papel toalla. Aproximadamente, 30 g de material fecal se colectó directamente del recto de los bovinos usando guantes de látex estériles. Las muestras se conservaron en neveras que contenían contenedores de hielo y se trasladaron a la Unidad de Diagnóstico de Virología Animal (UDVA) del CENSA donde se conservaron a -80ºC hasta su procesamiento.

De cada muestra fecal procesada se tomó 1g y se diluyó en 9 mL de medio DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con antibióticos [penicilina (500 000 UI/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) estreptomicina (0.5g/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y fungizona (5mg/mL) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)] y suero fetal bovino al 10 % (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (17). Seguidamente, las muestras se homogenizaron por agitación durante un minuto en vórtex y se clarificaron en una centrífuga Eppendorf 5427 a 12 000 g 15 min a 4ºC. El sobrenadante se filtró por una membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm (Centrisart, Sartorius) y se conservó a -80ºC hasta se evaluación.

Tabla 2. Muestras fecales colectadas de bovinos con diarrea en unidades de cuatro provincias de Cuba: La Habana, Mayabeque, Villa Clara y Cienfuegos. / *Fecal samples collected from cattle with diarrhea in units from four provinces of Cuba: Havana, Mayabeque, Villa Clara, and Cienfuegos.*

Nombre de la unidad	Provincia	Número de muestras
U-1	La Habana	4
U-2	Mayabeque	6
U-3	Mayabeque	2
U-4	Villa Clara	2
U-5	Villa Clara	4
U-6	Villa Clara	4
U-7	Cienfuegos	5
Total de muestras		**27**

Evaluación de las muestras

Las muestras fecales colectadas se evaluaron por el nuevo ensayo de RT-PCR en tiempo real basado en SYBR Green I, por la técnica de aislamiento viral (AV) y por la PCR en punto final descrito por Tsunemitsu *et al.* (16).

Aislamiento viral

Se utilizaron células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK), que se mantuvieron en medio DMEM (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) con un 10% de suero fetal bovino (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a una concentración final de 0,5%. La inoculación se realizó como se detalla a continuación: se emplearon placas de 24 pozos con una monocapa confluente con una concentración de células de 3,5 x10^5 células/mL en medio DMEM suplementado con penicilina-estreptomicina 100 UI-µg/mL y con 5 % de suero fetal bovino (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), certificado libre de virus y micoplasmas). Se retiró el medio de cultivo de los pozos y se adicionó 200 µL de las muestras fecales procesadas para aislamiento viral. Después de la adsorción a 37°C durante 1 hora, las células se lavaron tres veces con PBS y se adicionaron 800 µL de medio de mantenimiento DMEM sin suero fetal y se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO_2. Las placas se observaron diariamente durante cinco días. Tanto las muestras que presentaron efecto citopático (EC) como las que tenían ausencia del mismo, se congelaron y descongelaron tres veces. Se realizó un pase sucesivo siguiendo el mismo procedimiento descrito con el primer pase. Pasados cinco días de incubación el sobrenadante de cada muestra se cosechó (realizando tres congelaciones y descongelaciones) y se conservó a -80ºC en alícuotas de 0,5 mL, para su posterior evaluación por el ensayo de RT-PCR en punto final.

Detección del genoma por RT-PCR en punto final

Se realizó la extracción de ARN por el método propuesto por Casas *et al*. (15). El segmento de 407 pb del gen de la nucleocápsida de BCoV se amplificó mediante un ensayo de RT-PCR en punto final. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µL que contenía: 25 µL de 1x GoTaq Green Master Mix [200 µM de cada dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$ (pH 8.5)] (Promega, Madison, WI, USA), 0,5 µM de los cebadores sentido y antisentido (5´-GCCGATCAGTCCGACCAATC-3´ / 5´-AGAATGTCAGCCGGGGTAT-3´) propuestos por Tsunemitsu *et al*. (16), 5 µL de cada ADNc y 19 µL de agua libre de nucleasas (Promega, Madison, WI, USA). La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler) bajo las siguientes condiciones: 94ºC durante 4 min, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94ºC por 1 min, alineamiento a 58ºC por 1 min y extensión a 72ºC por 2 min. La extensión final se realizó a 72ºC por 7 min.

Detección del genoma por el nuevo ensayo de RT-PCR en tiempo real basado en SYBR Green I desarrollado

La reacción de amplificación se realizó con las condiciones que se establecieron durante la estandarización del ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha documentado que los ensayos de rPCR requieren una adecuada optimización, cuando esto no ocurre sólo alcanzan valores de eficiencia de amplificación que no superan el 75 % (18). Para evitar estos inconvenientes es imprescindible realizar una precisa y certera optimización de los parámetros de la reacción que incluyen tanto los involucrados con el sistema (componentes críticos de la reacción de PCR) como los del entorno termodinámico (19).

Un punto clave para la optimización de los ensayos de PCR lo constituye la extracción del ácido nucleico y el tipo de muestra a partir de la cual se realizará su detección. Se necesita emplear una metodología capaz de rendir ADN o ARN de calidad y cantidad suficiente para desarrollar la PCR, reduciendo al mínimo las sustancias que puedan inhibirla. En este estudio, el ensayo de rRT-PCR se optimizó para la detección del BCoV en muestras fecales. En general, las heces constituyen una matriz compleja para el diagnóstico, ya que las sustancias inhibidoras que siempre están presentes en las heces pueden interferir en la reverso transcripción o en la amplificación, dando como resultado una muestra falsa negativa (20). El método de extracción de ácido nucleico utilizado fue el propuesto por Casas *et al.,* 1995, desarrollado específicamente para heces fecales, un tipo de muestra con alto contenido de inhibidores y que ha demostrado eficacia en su remoción en estudios previos (15).

Otro elemento de gran importancia en la reacción lo constituye la pareja de cebadores utilizados. Los cebadores seleccionados amplifican una región de 407 pb que abarcan desde el nucleótido 92 hasta el 480 del gen de la nucleocápsida del BCoV. La evaluación *in sílico* de los cebadores seleccionados mostró valores altos de eficiencia de hibridación (P.E) (478 < P.E < 555). Estos resultados se obtuvieron a partir de la fórmula de la P.E del programa Oligo (Rychlik y Rychlik, 2000), que cuantifica la probabilidad de que un oligonucleótido dado se hibride en un sitio determinado en la secuencia molde. La eficiencia de hibridación en este estudio se estimó con 54 secuencias.

En todos los casos se obtuvieron valores de P.E superiores a 210; se conoce que valores superiores a esta magnitud provocan una hibridación adecuada durante la reacción de PCR, mientras que valores inferiores, pudieran resultar en una falsa hibridación o en la ausencia de esta. Estos resultados indican que los cebadores seleccionados presentan un alta P.E frente a todas las secuencias de BCoV obtenidas del GenBank.

Con el empleo del programa Oligo versión 7.0 se obtuvo además la Tm específica teórica para el amplicón resultante de este ensayo, con valor de 84,9 °C; la cual puede tener una diferencia de un grado con la temperatura *in vitro*. Las diferencias que pudieran existir entre las Tm teóricas y las *in vitro* están fundamentadas por la contribución de los iones Mg^{2+} en el medio, así como de los monocationes y dNTPs libres, parámetros que por lo general son subestimados por lo programas de evaluación de cebadores.

Las reacciones basadas en la detección de SYBR Green I están por lo general sesgadas por el hecho de que se detecta, además, la amplificación de dímeros de cebadores durante el curso de la reacción (21).

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 Applied Science incorporó en el programa LightCycler® el cálculo de la segunda derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura (22) lo que facilitó la discriminación y cuantificación de los productos obtenidos con SYBR Green I sin la necesidad de utilizar sondas específicas (23). A partir de este momento el análisis de resolución de curvas de disociación ha formado parte indispensable en los ensayos de rPCR basados en SYBR Green I (24). Por este motivo un elemento de gran importancia es conocer la Tm específica teórica para el amplicón resultante de la pareja de cebadores que se va a emplear en un ensayo.

La temperatura de alineamiento (Ta) de los cebadores al molde de ADN es el primer parámetro a ajustar entre las variables de la reacción de PCR (25), la cual está directamente relacionada con la Tm. Esta a su vez, está determinada por el número y la composición de bases de los oligonucleótidos, en particular por el porcentaje de bases GC del total. La expresión más aceptada por la comunidad científica para predecir la temperatura óptima de alineamiento de los cebadores al molde es la fórmula de Rychlik (Expresión 1).

Expresión 1:

$$Ta = 0.3\,x\,(Tm_cebadores) + 0.7\,x\,(Tm_del_producto) - 25$$

Leyenda: Ta es la temperatura óptima de alineamiento, Tm de los cebadores es la temperatura de disociación de los cebadores, Tm del producto es la temperatura de disociación del producto amplificado y los términos restantes son constantes a concentraciones fijas de los componentes de la reacción (26).

La temperatura de alineamiento (Ta) predicha por el modelo teórico fue de 58°C. Tras evaluar experimentalmente tres temperaturas cercanas a este valor (58°C, 60°C y 62°C) con diluciones seriadas del molde, el análisis de las curvas de disociación determinó que la Ta óptima para este ensayo fue de 60°C.

El resultado de Ta óptima de 60ºC experimental con relación al cálculo teórico, puede ser el resultado del ΔG de la reacción y de las condiciones de optimización del ensayo que influyen en este parámetro como son la concentración de los cebadores, del catión monovalente y de magnesio libre en la reacción que se fijan para el cálculo teórico de Ta. 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 $MgCl_2$ establecidas en este ensayo fueron 0,2 µM y 3 mM, respectivamente. La mezcla del PCR final contenía 0,2 µM de cada cebador, 2 µL de FastStart DNA Master SYBR Green I (8µL de $MgCl_2$ 25 mM) (concentración final de 3 mM), 5 µL del ADN molde; la temperatura óptima de alineamiento seleccionada fue de 60ºC (Fig. 1).

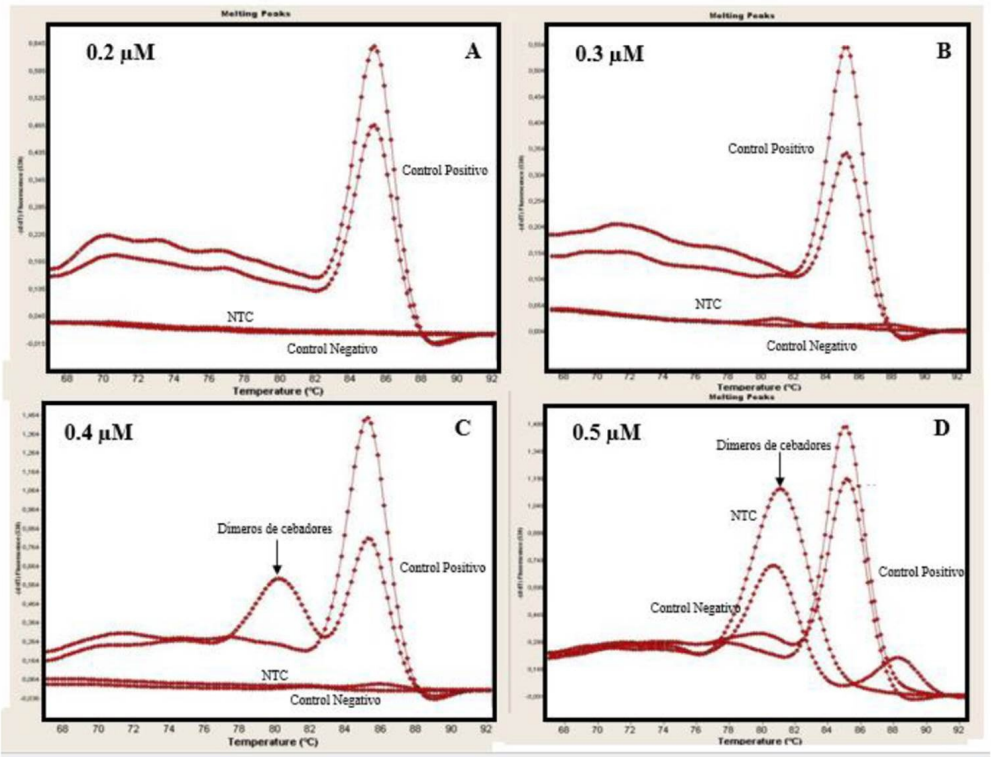


Figura 1. Evaluación de la concentración óptima de cebadores en el ensayo rRT-PCR. Se muestran las curvas de disociación correspondiente a los valores de concentraciones evaluadas: A) 0,2 µM, B) 0,3 µM, C) 0,4 µM y D) 0,5 µM. / *Evaluation of optimal primer concentration in the rRT-PCR assay. Dissociation curves corresponding to the evaluated concentration values are shown: A) 0.2 µM, B) 0.3 µM, C) 0.4 µM, and D) 0.5 µM.*

Sensibilidad analítica por dosis infectiva

En la evaluación de la sensibilidad analítica a partir de diluciones seriadas en base 10 en sobrenadante de muestras fecales negativas a BCoV, el límite de detección del ensayo de rRT-PCR basado en SYBR Green I fue $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/mL (Fig. 2). A pesar de que la muestra clínica constituye una matriz compleja con inhibidores de la PCR, la sensibilidad analítica alcanzada en este estudio es similar a la reportada por otros ensayos en tiempo real (27). Sin embargo, este valor demuestra la elevada sensibilidad analítica de los ensayos de rPCR que garantizan la detección del agente aún en cargas virales muy bajas (28).

De este modo, el ensayo optimizado define como resultado positivo la combinación de tres criterios: 1) un Ct inferior a 35, 2) una curva de amplificación con incremento exponencial, y 3) una curva de disociación con un pico único a 85 ± 1 °C, característico del BCoV.

El ensayo también resultó ser específico, ya que solo se obtuvo una curva de amplificación con un valor de temperatura de disociación de 85^{0}C con la cepa Kakegawa del BCoV. El ensayo no amplificó el ácido nucleico del resto de los virus evaluados, que son virus homólogos y heterólogos que afectan al bovino como el herpesvirus bovino 1, el virus de la diarrea viral bovina y el rotavirus bovino, así como un virus estrechamente relacionado genéticamente como el virus de la bronquitis infecciosa aviar.

El ensayo de rRT-PCR desarrollado demostró una alta repetibilidad, con coeficientes de variación (CV) intra-ensayo de 0.5-1.2% e inter-ensayo de 1.4-2.1%. Ambos rangos cumplen con los criterios de aceptación preestablecidos (CV < 2% para intra-ensayo y < 3% para inter-ensayo) (12). Estos resultados validan la robustez del método y sustentan su utilidad como herramienta de diagnóstico en la práctica clínica (12).

Evaluación del desempeño diagnóstico del ensayo de rRT-PCR en muestras fecales

Evaluación de las muestras por aislamiento viral

De las 35 muestras fecales procesadas mediante cultivo celular, se obtuvieron 12 aislamientos viables (34.3 %), los cuales fueron identificados como BCoV mediante RT-PCR de punto final. Cabe destacar que se logró aislar el virus en muestras procedentes de todas las unidades afectadas, abarcando las diferentes provincias del estudio.

La multiplicación viral se evidenció por la observación del EC característico de este virus al quinto día después de la inoculación (Fig. 3). El EC inicialmente se manifestó como un efecto focal de redondeamiento celular, que más tarde se extendió afectando toda la monocapa celular y donde además se observaban células redondeadas. Entre las 72 a 96 horas después de la inoculación se observó que la mayor parte de la monocapa se desprendía, coincidiendo con lo descrito por Seid *et al.* (17) para este virus. Las células empleadas como controles permanecieron sin alteraciones durante el tiempo de observación, por lo que las alteraciones descritas se atribuyeron a la presencia de BCoV.

La identidad de los aislamientos obtenidos se confirmó por el ensayo de RT-PCR en punto final, donde en todos los casos se obtuvo el fragmento de la talla esperada de 407 pb con el empleo de los cebadores específicos (16), diseñados a partir del gen que codifica la proteína de la nucleocápsida de BCoV.

Pese a la reconocida dificultad del aislamiento primario del BCoV en cultivo celular para fines diagnósticos rutinarios (29), su realización sigue siendo imprescindible. Esto se debe a dos razones principales: primero, para obtener cepas de tipo salvaje necesarias en investigación (estudios virológicos, antigénicos y moleculares); y segundo, para generar los paneles de muestras requeridos en los ensayos de validación, ya que el aislamiento viral sigue siendo la técnica de referencia en virología (12).

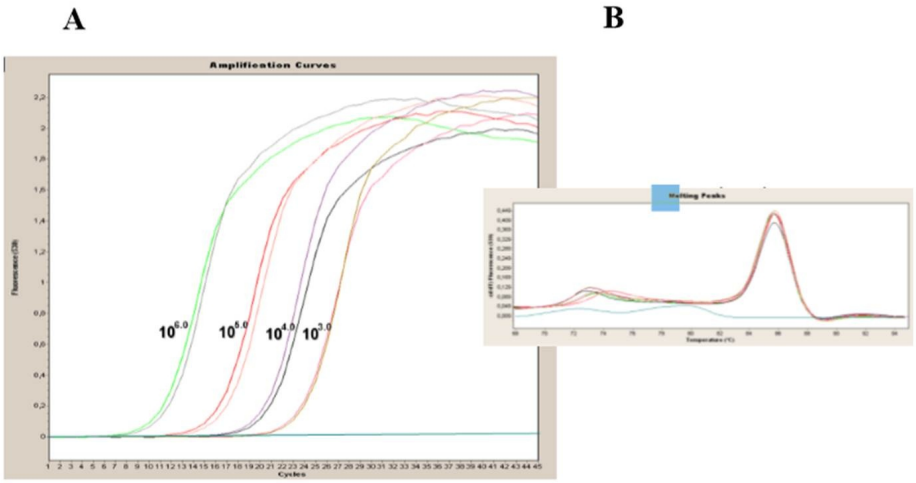


Figura 2. Sensibilidad analítica del ensayo de rRT-PCR para detección del BCoV. A. Curvas de amplificación de ARN de la cepa Kakegawa extraído a partir de diluciones seriadas del virus en suspensión de heces. B. Análisis de curvas de disociación para cada dilución. Control negativo de amplificación: agua libre de nucleasas. / *Analytical sensitivity of the rRT-PCR assay for BCoV detection. A. Amplification curves of RNA from the Kakegawa strain extracted from serial virus dilutions in fecal suspension. B. Dissociation curve analysis for each dilution. Negative amplification control: nuclease-free water.*

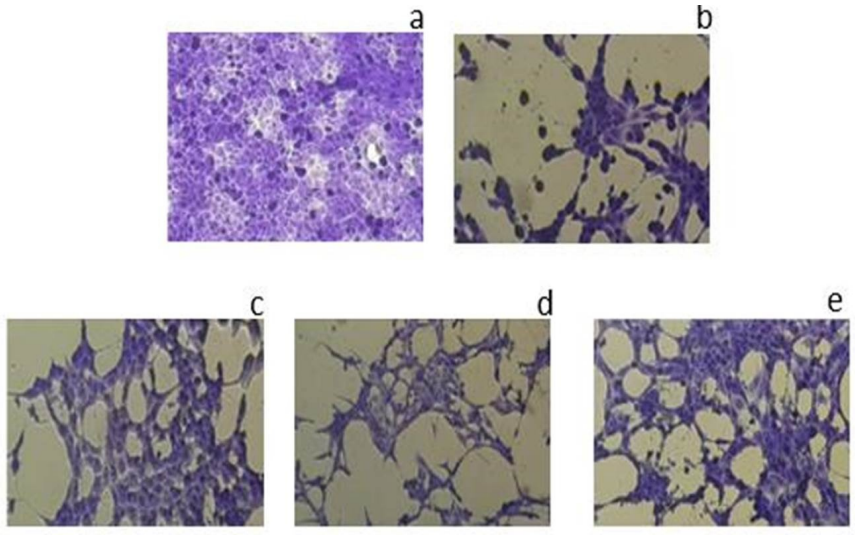


Figura 3. Cultivo de células MDBK. Tinción con cristal violeta. a) control de células no Inoculadas. Agrupación de células redondeadas y retracción de la monocapa celular inoculada con muestras fecales procedentes de las diferentes provincias de Cuba: b) La Habana, c) Mayabeque, d) Villa Clara y e) Cienfuegos. / *MDBK cell culture. Crystal violet staining. a) Non-inoculated cell control. Clustering of rounded cells and retraction of the cell monolayer inoculated with fecal samples from the different provinces of Cuba: b) Havana, c) Mayabeque, d) Villa Clara, and e) Cienfuegos.*

Competencia del ensayo con muestras clínicas

La competencia del nuevo ensayo de rRT-PCR desarrollado, para la detección de BCoV en muestras clínicas, se evaluó por el análisis de 35 muestras fecales que se comparó con el ensayo de RT-PCR en punto final y el aislamiento viral (Tabla 3).

Un total de 24 muestras fueron positivas a BCoV por el nuevo ensayo rRT-PCR desarrollado, para un 88,9 % de positividad de las muestras evaluadas. Sin embargo, sólo 12 muestras (44,4 %) fueron positivas por AV y 19 muestras fueron positivas por RT-PCR en punto final (70,4 %).

Todas las muestras positivas por AV se detectaron por el nuevo ensayo de rRT-PCR desarrollado. Sin embargo, 12 muestras positivas por rRT-PCR escaparon a la detección por AV (falsos negativos). Este hecho, pudiera estar sustentado por dos razones, en primer lugar, porque el AV puede fallar ante cargas virales bajas (30) y en segundo lugar porque está descrito por varios autores que el AV resulta difícil para este virus (29). Las 12 muestras a partir de las cuales se obtuvieron los aislados presentaron valores de Ct inferiores a 29 por el ensayo de rRT-PCR, lo cual sugiere que el AV sólo es exitoso en muestras donde está presente una carga viral media o alta (31).

Resultados similares a los obtenidos en este estudio fueron publicados por Martínez *et al*. (32), donde de 103 muestras de heces evaluadas para coronavirus bovino por ensayo de RT-PCR en punto final fueron detectados en 73 muestras positivas para un 88 % de positividad y solo obtuvieron 10 aislamientos. Hansa *et al.* (33) identificaron 101 muestras fecales procedentes de terneros con diarreas con menos de tres meses edad, confirmadas como positivas por un kit de antígeno de ELISA comercial, de las cuales sólo 15 muestras fueron positivas por aislamiento viral.

De igual forma, todas las muestras positivas por el ensayo de RT-PCR en punto final se detectaron por el nuevo ensayo rRT-PCR desarrollado y ninguna de las muestras informadas como negativas por el ensayo de tiempo real resultaron positivas por el método de RT-PCR en punto final. Solo cinco muestras positivas por rRT-PCR escaparon a la detección por el ensayo de PCR en punto final (falsos negativos). Es de señalar que todas estas muestras tenían cargas virales bajas con valores de Ct que oscilaban entre 32 y 35. Este resultado demuestra una vez más que el rRT-PCR es más sensible que el RT-PCR en punto final, debido a que tiene un amplio rango dinámico que le permite detectar cantidades mínimas de la muestra, aún 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 se requieren 1000 veces menos cantidad de ARN que el PCR en punto final (34). Esta característica, junto a que esta técnica combina los pasos de amplificación del ADN y de detección al mismo tiempo, sin necesidad de tener que requerir de geles de agarosa para detectar los productos amplificados, constituyen dos de las ventajas más importantes de este nuevo ensayo.

La diferencia encontrada en cuanto al elevado número de muestras positivas detectadas por los ensayos basados en la PCR, en particular con el nuevo ensayo desarrollado, con respecto al AV justifican que estos ensayos hayan desplazados al AV como "estándar de oro" para muchas enfermedades virales. De ahí, que Hoffmann *et al.* (35) propongan los ensayos de rPCR como el ensayo de referencia para varias enfermedades virales que afectan animales de interés económico.

La elevada sensibilidad analítica, la especificidad, así como la repetibilidad y el desempeño del ensayo obtenido en el presente estudio sobre las muestras clínicas, lo convierten en una herramienta útil para la detección rápida y certera de BCoV. Sin embargo, teniendo en cuenta lo descrito por Pérez *et al.* (36) quien plantea que uno de los aspectos críticos de los ensayos de rPCR es la necesidad de su continua validación y monitoreo sobre cepas representativas de las especies circulantes y su desempeño en diferentes matrices, se hace necesario su evaluación en muestras de exudado rectal y nasal, para demostrar el uso del mismo en el diagnóstico de BCoV cuando se esté presentando sintomatología respiratoria, aspecto que será abordado en estudios posteriores.

Tabla 3. Comparación de la detección de BCoV en 35 muestras fecales por aislamiento viral y por los ensayos de rRT-PCR y en punto final. / *Comparison of BCoV detection in 35 fecal samples by viral isolation and by rRT-PCR and end-point assays.*

Provincia	Unidad	AV	RT-PCR en punto final	rRT-PCR (Ct)
La Habana	U-1	Negativo	Positivo	30,64
		Positivo	Positivo	25,68
		Negativo	Negativo	34,10
		Negativo	Negativo	Negativo
Mayabeque	U-2	Positivo	Positivo	26,26
		Positivo	Positivo	22,45
		Negativo	Positivo	30,62
		Positivo	Positivo	23,66
		Negativo	Negativo	33,58
		Positivo	Positivo	25,88
	U-3	Positivo	Positivo	25,85
		Negativo	Positivo	30,76
		Negativo	Negativo	Negativo
		Negativo	Negativo	Negativo
		Negativo	Negativo	Negativo
		Negativo	Negativo	Negativo
		Negativo	Negativo	Negativo
		Negativo	Negativo	Negativo
		Negativo	Negativo	Negativo
		Negativo	Negativo	Negativo
Villa Clara	U-4	Negativo	Negativo	34,76
		Positivo	Positivo	22,36
	U-5	Positivo	Positivo	27,13
		Positivo	Positivo	31,42
		Negativo	Negativo	33,34
		Negativo	Negativo	Negativo
	U-6	Negativo	Positivo	32,9
		Positivo	Positivo	28,94
		Negativo	Positivo	32,65
		Positivo	Negativo	Negativo
Cienfuegos	U-7	Positivo	Positivo	27,45
		Negativo	Positivo	31,86
		Negativo	Positivo	31,73
		Negativo	Negativo	32,55
		Positivo	Positivo	26,66
P/T		12/27	19/27	24/27
% Positivos		44,4	70,4	88,9

P/T: Total de muestras positivas por esa técnica/Total de muestras procedentes de animales con síntomas clínicos.

CONCLUSIONES

La rapidez y el alto rendimiento del ensayo de rRT-PCR desarrollado proporciona una herramienta poderosa para el diagnóstico de la infección por BCoV en Cuba. Este ensayo proporciona un buen desempeño analítico con elevada sensibilidad y especificidad para la detección de BCoV en muestras fecales, con una sensibilidad superior al AV y PCR en punto final en muestras clínicas fecales.

REFERENCIAS

1. FAO (2017). Políticas públicas y marcos institucionales para la agricultura.
2. Sánchez OP, Bermejo PM. Brotes [outbreaks], epidemias [epidemics], eventos [events], and other epidemiological terms of daily usage. Revista Cubana de Salud Pública. 2020;46(2):1-16.
3. Almenarez Segura, W. Elementos para una estrategia de desarrollo productivo sostenible con enfoque sistémico en una Unidad Empresarial de Base Pecuaria. *Revista Ciencia Universitaria*. 2022;20(1). Recuperado a partir de https://revistas.unah.edu.cu/index.php/cu/article/view/1573
4. Vlasova AN, Saif LJ. Bovine Coronavirus and the associated diseases. Front. Vet. Sci. 2021;8:293-307.
5. Zhu Q, Li B, Sun D. Advances in Bovine Coronavirus Epidemiology. Viruses. 2022; 14(5):1109. https://doi.org/10.3390/v14051109. PMID: 35632850; PMCID: PMC9147158.
6. Curiel M, Díaz C, Mesa D, Acevedo AM, Coronado L, Obret Y, Chávez G, Perera, CL. Disentería de invierno asociada con el coronavirus bovino en vacas de la provincia Mayabeque, Cuba. Rev Salud Anim. 2021;43(3).
7. Cho HC, Kim Y, Cho YI, Park J, Choi KS. Evaluation of bovine coronavirus in Korean native calves challenged through different inoculation routes. Vet Res. 2024;55(1):74. https://doi.org/10.1186/s13567-024-01331-9. PMID: 38863015; PMCID: PMC11165853.
8. Sarkar SL, Alam ASMRU, Das PK, Pramanik MHA, Al-Emran HM, Jahid IK, Hossain MA. Development and validation of cost-effective one-step multiplex RT-PCR assay for detecting the SARS-CoV-2 infection using SYBR Green melting curve analysis. Sci Rep. 2022;12(1):6501. https://doi.org/10.1038/s41598-022-10413-7. PMID: 35444203; PMCID: PMC9019801.
9. Smith DR, Fedorka-Cray PJ, Mohan R, Brock KV, Wittum TE, Morley PS, Hoblet KH, Saif LJ. Epidemiologic herd-level assessment of causative agent and risk factors for winter dysentery in dairy cattle. Am J Vet Res. 1998;59:986-993.
10. Barrera Valle M, Rodríguez Batista E, Betancourt Martell A, Frías Lepuroux M T, Brandão P. Short communication. First report in Cuba of bovine coronavirus detection in a winter dysentery outbreak. Span. J. Agric. Res. 2006;4(3):221-224.
11. Martínez N, Rodríguez M, Barrera M. New outbreaks of bovine coronavirus in dairies of Havana. Rev. Salud Anim. 2010;32:135.
12. OMSA. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Manual Terrestre de la OMSA. 2023;1-18.
13. Rodríguez Rodríguez G, Rodríguez A, Ángel M, Herzberg Z, Alfonso Á. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Mens Bioquím. 2021;45: 11-22.
14. Pansria P, Katholma J, Kroghb KM, Aagaardc AK, Schmidtc LM, Kudirkienec E, et al. Evaluation of novel multiplex qPCR assays for diagnosis of pathogens associated with the bovine respiratory disease complex. The Vet.J. 2020;256:1-9.
15. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. J Virolog Met.1995;53:25-36.
16. Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ. Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. Arch Virol. 1999;144(1):167-175.
17. Seid U, Dawo F, Tesfaye A, Ahmednur M. Isolation and Characterization of Coronavirus and Rotavirus Associated with Calves in Central Part of Oromia, Ethiopia. Vet Medi.Int. 2020:1-10.
18. Bialek K, Czajka M, Bialas W, Juszczuk- Kubiak E. Optimization of quantitative PCR reaction conditions for the study of gene expresión in lactic acid bacteria. Scientific Reports. 2021; 11, (1): 23581. http://doi.org/10.1038/s41598-021-02987-5.
19. Lowe AJ, Jones AE, Ray S, Wall M. PCR primer design and reaction optimization. En M. A. Williams (Ed.), PCR. 2017: 33-48. Humana Press. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-51_2.
20. Asano KM, Souzaa SPD, De Barros IN, Ayres GR, Silva SOS, Richtzenhaina L J, et al. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. J. Virolog. Met.2010; 169(2):375-379.
21. Silva TL, Cargnelutti JF, Weiblen R, Flores EF. Evaluation of primer-probe sets for SYBR green I-based real-time RT-PCR detection of bovine coronavirus in fecal simples. Brazilian Journal of Microbiology. 2022;53(1):345-354.
22. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler ™: A Microvolume Multisample Fluorimeter with Rapid Temperature Control. BioTechniques. 1997;22:176-181.
23. Ririe K, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Analytical Biochemestry. 1997;245:154-160.
24. Acevedo AM, Martínez N, Brandão P, Perera CL, Frías MT, Barrera M, et al. Phylogenetic and molecular characterization of coronavirus affecting species of bovine and birds in Cuba. Biotecnol Apl. 2013;30(3):228-231.
25. Wang L, Zhang H, Zhou M. Optimization of anneling temperaturein a one-step SYBR Green RT-PCR for sensitive detection of bovine coronavirus. Molecular and Cellular Probes. 2023;68:100190.
26. Costa AM, Santos RV, Lima MT. A SYBR Green I RT-qPCR assay with melting temperature analysis for specific detection of bovine coronavirus in fecal samples. Brazilian Journal of Microbiology. 2023;54(2):987-995.

27. Pansria P, Katholma J, Kroghb KM, Aagaardc AK, Schmidtc LM, Kudirkienec E, et al. Evaluation of novel multiplex qPCR assays for diagnosis of pathogens associated with the bovine respiratory disease complex. The Vet J. 2020;256: 1-9.
28. Johnson RP, Smith TG, Davis KL. Analytical validation of a real-time RT-PCR assay for bovine coronavirus: determination of limit of detection using infectiousvirus titers. J Vet Res. 2023;67(2):245-253.
29. Hodnik JJ, Ježek J, Starič J. Coronaviruses in cattle. Trop Anim Health Prod. 2020;52(6):2809-2816.
30. Pérez LJ, Díaz De Arce H, Tarradas J, Rosell R, Perera CL, Muñoz M, et al. 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 Virol Met. 2011;174(1-2):53-59.
31. Delgado LG, Marrero-Perera R, Báez LC, López YH, Acevedo AM, Vento DR. et al. Ensayo de PCR en tiempo real basado en SYBR-Green I para la detección de herpesvirus bovino tipo 1. Rev Salud Anim. 2019;41(3):1-10.
32. Martínez A, Silva S, Caballero M, Pichardo M, Cortés R, Bonilla JL, et al. Jornada de Investigación en Ganadería de la Leche, 26-27 de enero de 2016. Memorias.
33. Hansa A, Rai RB, Dhama K, Wani MY, Saminathan M, Ranganath GJ. Isolation of Bovine Coronavirus (BCoV) in vero cell line and its confirmation by direct FAT and RT-PCR. Pakitan J Biol Science. 2013;16(21):1342-1347.
34. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. Front Microbiol. 2017;8:108-117.
35. Hoffmann B, Beer M, Reid SM, Mertens P, Oura CA, Rijn PAV, 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 Organisation for Animal Health. Vet Microbiol 2009;139(1-2):1-63.
36. Pérez LJ, Díaz De Arce H, Cilloni F, Salviato A, Marciano S, Perera CL, et al. An SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for the detection of H5 hemagglutinin subtype avian influenza virus. Mol Cell Prob. 2012;26:137-145.