



Abanico Microbiano. Enero-Diciembre, 2025; 1:1-16. <https://doi.org/10.21929/abanicomicrobiano/2025.6>

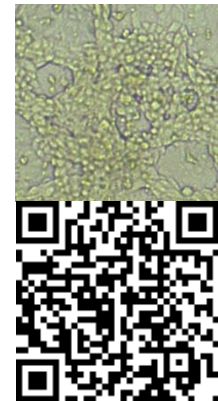
Artículo Original. Recibido: 29/08/2025. Aceptado: 05/11/2025. Publicado: 06/12/2025. Clave: 2025-6.

<https://www.youtube.com/watch?v=FmFfdKDZACY>

Desarrollo de una PCR en tiempo real multiplex para la detección de BoHV-1 y BVDV en semen bovino criopreservado

Development of a multiplex real-time PCR for the detection of BoHV-1 and BVDV in cryopreserved bovine semen

Ramos-Jonapá Carlos^{*1ID}, Zelaya-Molina Lily^{2ID}, Guzmán-Rodríguez Luis^{2ID}, Urbán-Duarte David^{2ID}, Álvarez-Gallardo Horacio^{2ID}, Rojas-Anaya Edith^{3ID}



¹Universidad de Guadalajara, Centro Universitario en Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Posgrado Interinstitucional en Producción Pecuaria. Zapopan, Jalisco, México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Recursos Genéticos. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campo Experimental La Campana. México. *Autor de correspondencia: Ramos-Jonapá Carlos. E-mail: karlos_mvz09@hotmail.com, lilyzelayam@yahoo.com.mx, guzman.luis@inifap.gob.mx, urban.david@inifap.gob.mx, alvarez.horacio@inifap.gob.mx, rojas.edith@inifap.gob.mx

RESUMEN

En México, la inseminación artificial es una de las principales biotecnologías reproductivas en la ganadería bovina, empleada para incrementar la productividad y el mejoramiento genético del hato. No obstante, gran parte del semen utilizado se procesa a nivel de campo sin un control sanitario estricto, lo que incrementa el riesgo de diseminación de agentes infecciosos como el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y el herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1). Para fortalecer la detección de estos patógenos, se desarrolló una PCR en tiempo real multiplex con sondas TaqMan, capaz de identificar simultáneamente ambos virus en semen bovino criopreservado. Se emplearon controles positivos consistentes en virus de referencia replicados en células MDBK y, como controles negativos, sobrenadantes de células no infectadas y semen libre de los virus. Los cebadores y sondas se diseñaron a partir de secuencias depositadas en GenBank: el gen *E2* para BVDV y la glicoproteína *gB* para BoHV-1; adicionalmente, se utilizó el gen de β -actina de *Bos taurus* como constitutivo. Los ensayos demostraron amplificación específica en pruebas de punto final y resultados satisfactorios en tiempo real. Los hallazgos obtenidos permiten establecer una prueba diagnóstica multiplex que contribuirá a la bioseguridad en programas de inseminación artificial, con la finalidad de minimizar el riesgo de transmisión de BVDV y BoHV-1 a través del semen.

Palabras clave: inseminación artificial, TaqMan, bioseguridad.

ABSTRACT

In Mexico, artificial insemination constitutes one of the main reproductive biotechnologies applied in cattle farming, aimed at increasing herd productivity and genetic improvement. However, a large proportion of the semen used in this technique is processed in the field without strict sanitary control, which increases the risk of spreading infectious agents such as bovine viral diarrhea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1). To strengthen the detection of these pathogens, a multiplex real-time PCR assay with TaqMan probes was developed to simultaneously identify both viruses in cryopreserved bovine semen.



Positive controls consisted of reference viruses replicated in MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) cells, and negative controls included supernatants of non-infected cells and semen free of both viruses. Primers and probes were designed from sequences deposited in GenBank: the *E2* gene for BVDV and the *gB* glycoprotein for BoHV-1; additionally, the bovine β -actin gene of *Bos taurus* was used as a constitutive control. The primers showed amplification in endpoint assays and satisfactory results in real-time assays with positive controls. These findings establish a multiplex detection assay that will contribute to biosafety in artificial insemination programs, reducing the risk of BVDV and BoHV-1 transmission through semen.

Keywords: artificial insemination, TaqMan, biosafety.

INTRODUCCIÓN

La sanidad en la ganadería bovina representa un reto a nivel mundial, y su deficiencia impacta de manera directa en las pérdidas económicas tanto de los productores como de los países. En México, la encuesta nacional agropecuaria indica que la mayoría de las unidades de producción utilizan la inseminación artificial con el propósito de mejorar la genética del hato y disminuir la transmisión de enfermedades reproductivas. Sin embargo, no todo el semen comercializado proviene de centros de procesamiento de semen (CEPROSEM); gran parte se procesa a nivel de campo, lo que dificulta conocer con certeza su estado sanitario y aumenta el riesgo de diseminar agentes infecciosos que reducen la productividad. Entre estos patógenos destacan el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y el herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), ambos distribuidos globalmente, salvo en algunos países europeos que han logrado erradicar IBR ([Iscaro et al., 2021](#); [Rimayanti et al., 2024](#); [Bettini et al., 2023](#)). Estas infecciones ocasionan pérdidas económicas considerables debido a disminución de la fertilidad, abortos, muerte neonatal y restricciones en el comercio internacional de semen y embriones.

El BVDV es un virus envuelto del género *Pestivirus* (familia *Flaviviridae*), con genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva (~15.5 Kb). El genoma se encuentra compactado en una cápside proteica y rodeado por una membrana fosfolipídica que porta tres glicoproteínas (Erns, E1 y E2), clave en la entrada viral y en la respuesta inmune del hospedador ([Liu et al., 2022](#)). Presenta dos genotipos principales (BVDV-1, baja mortalidad; y BVDV-2, alta mortalidad) y dos biotipos (citopático, cp; y no citopático, ncp) que difieren en sus efectos sobre las células hospedadoras ([Al-Kubati et al., 2021](#); [Colitti et al., 2019](#)). La transmisión ocurre de forma horizontal a través de secreciones respiratorias, saliva, semen, secreciones uterinas, fluidos placentarios, heces, orina y leche; o de manera vertical, mediante transferencia embrionaria o infección de hembras gestantes con el biotipo ncp antes de los 125 días de gestación, lo que genera animales persistentemente infectados (PI), considerados los principales reservorios del virus ([Larghi, 2018](#); [Jia et al., 2020](#)). Las infecciones pueden ser subclínicas o moderadas, y se asocian a inmunosupresión, problemas respiratorios, digestivos y reproductivos. Las cepas de alta virulencia ocasionan trombocitopenia y lesiones ulcerativas en mucosas, mientras que la enfermedad de las mucosas, presente en animales PI, se caracteriza por úlceras en cavidad nasal, boca y tracto digestivo, diarrea acuosa, descarga nasal,



salivación y lesiones en pezuñas que generan claudicaciones acompañadas de fiebre ([Bachofen et al., 2010](#)).

El BoHV-1, agente causal de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*. Posee un genoma de DNA bicatenario lineal y una cápside icosaédrica rodeada por una envoltura lipídica que contiene aproximadamente 12 glicoproteínas, entre ellas gB, gC, gD y gE, que participan en la entrada viral, propagación y evasión inmune del hospedador. Se reconocen subtipos BoHV-1.1 (principalmente respiratorio) y BoHV-1.2a/1.2b (principalmente genital), asociados a distintos tropismos celulares y manifestaciones clínicas ([d'Offay et al., 2016](#)). La transmisión puede ser horizontal (secreciones nasales, orofaríngeas, genitales y oculares) o vertical (infección intrauterina o durante el parto). En machos, el virus puede localizarse en mucosa prepucial y peneana, incluso en donadores de semen negativos por pruebas diagnósticas, lo que refleja la posibilidad de falsos negativos. El BoHV-1 puede establecer infección latente en neuronas sensoriales de ganglios trigémino y sacro, reactivándose bajo estrés o inmunosupresión, por lo que genera infecciones recurrentes y contribuye a la persistencia del virus en el hato ([Chase et al., 2017](#); [Chothe et al., 2018](#)). La forma respiratoria de la enfermedad se manifiesta con fiebre, tos, descarga nasal serosa a purulenta y conjuntivitis, mientras que la forma genital provoca vulvovaginitis, balanopostitis, infertilidad, abortos y mortinatos. La infección fetal puede ocurrir a través de la placenta o durante el parto, con riesgo de mortalidad neonatal. Los animales subclínicos también representan un reservorio silencioso que favorece la diseminación del virus ([Nettleton & Rusell, 2017](#)).

Entre los métodos diagnósticos disponibles, el aislamiento viral es considerado el estándar de referencia, aunque requiere monocapas celulares confluentes, un número suficiente de partículas virales y condiciones estrictas de laboratorio, lo que lo hace laborioso. Para BVDV y BoHV-1, las muestras recomendadas incluyen hisopados nasales u oculares, sangre fresca, suero, plasma, semen, órganos fetales y tejidos linfoides ricos en células (placas de Peyer, íleon, bazo, timo, pulmón e hígado); en el caso de BoHV-1, también se emplean tejidos fetales y placenta preferentemente ([Wellenberg et al., 2001](#); [Lin et al., 2021](#)). La detección de antígenos virales permite identificar proteínas conservadas en la superficie del virus de manera más rápida y económica que el aislamiento viral. En ELISA directa, el antígeno viral se fija a la placa y es detectado por un anticuerpo marcado con enzima; en ELISA indirecta, se detectan anticuerpos presentes en la muestra, los cuales se unen al antígeno y son reconocidos por un anticuerpo secundario marcado ([Wang & Pang, 2024](#); [Gutiérrez-Hernández et al., 2021](#); [Abad-Zavaleta et al., 2016](#)). Asimismo, la inmunohistoquímica permite localizar el antígeno viral directamente en tejidos, lo que proporciona información sobre la distribución y replicación del virus.

Actualmente, las técnicas moleculares basadas en PCR han demostrado mayor sensibilidad y especificidad. Para virus de RNA como BVDV, el uso de RT-PCR permite



retrotranscribir el genoma viral a cDNA y detectar material genético con alta precisión, mientras que la PCR en tiempo real facilita la cuantificación y la interpretación rápida de resultados, aplicable a diversas muestras como sangre, suero, secreciones nasales y genitales, así como semen (Lin *et al.*, 2021). En este contexto, resulta necesario desarrollar pruebas moleculares capaces de detectar simultáneamente BVDV y BoHV-1 en semen bovino criopreservado. Aunque existen protocolos moleculares para la detección individual de estos virus, son escasos los reportes de ensayos multiplex aplicados específicamente al semen en México. Este trabajo propone el desarrollo de una PCR en tiempo real multiplex con el fin de fortalecer las medidas de bioseguridad en programas de inseminación artificial y reducir el riesgo de transmisión de estos patógenos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras biológicas

Se recolectaron 30 eyaculados y muestras de sangre de toros activos en el estado de Jalisco, México. Los eyaculados se depositaron en pajuelas francesas de 0.25 mL a una concentración de 20×10^6 espermatozoides/mL y se procesaron para criopreservación con un diluyente a base de lipoproteínas no penetrante (lecitina de soya). Posteriormente, las pajuelas se conservaron en nitrógeno líquido en el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. Las muestras de sangre se mantuvieron a 25 °C y se enviaron a un laboratorio externo para análisis complementarios.

Diseño de cebadores y sondas

La base de datos GenBank se consultó para seleccionar blancos moleculares específicos de cada agente viral. Para el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) se eligió el gen *E2*, y para el herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) el gen de la glicoproteína B (*gB*). Como control interno se seleccionó el gen β -actina de *Bos taurus*. Las secuencias se evaluaron en BioEdit para descartar homología no deseada y se verificaron mediante análisis filogenéticos en MEGA7. El diseño de los iniciadores se realizó en Fast PCR, se consideró un máximo de 25 bases por oligo, fragmentos ≤ 150 pb y temperaturas de alineamiento (T_m) en el rango de 65 ± 5 °C. Las sondas TaqMan se diseñaron con ≤ 30 bases y fluoróforos distintos (ROX y FAM), dado que el equipo de PCR en tiempo real no permite la detección simultánea de dos sondas con el mismo fluoróforo. Los cebadores y sondas se evaluaron en OligoEvaluator™ para determinar T_m , contenido GC, posibles dímeros y estructuras secundarias. Los oligonucleótidos seleccionados se sintetizaron en T4Oligo (Irapuato, México).

Cultivo celular MDBK e infección con cepas de referencia

Se empleó la línea celular MDBK ATCC CCL-22, derivada de riñón de novillo y con 130 pases. El cultivo se estableció en medio esencial mínimo (MEM, Gibco® 1X)



suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 2.5%, en frascos de 25 cm² (Corning®). La incubación se mantuvo a 37 °C con 5% de CO₂. Los subcultivos se realizaron cada 2 días al alcanzar ≥80 % de confluencia, se utilizó tripsina (Gibco® 1:250).

Las células MDBK se infectaron con las cepas de referencia de BVDV (ATCC-1561, no citopática) y BoHV-1 (ATCC-2181, citopática) para obtener controles positivos. La infección con BVDV se realizó en placas de 6 pozos, se adicionó 20 µL de virus a cultivos confluentes en MEM y se mantuvo la incubación durante 48 h, con observación microscópica cada 24 h. Para BoHV-1 se inocularon 20 µL de virus homogenizado en MEM sin SFB en frascos de cultivo con cultivos confluentes, incubándose bajo las mismas condiciones hasta la aparición de efecto citopático.

Extracción de material genético

La extracción de DNA de semen criopreservado se realizó con el método fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (Green & Sambrook, 2012). Brevemente, se descongeló 1.0 mL de semen criopreservado y se centrifugó a 4.000 rpm por 10 min. El pellet se lavó dos veces con PBS, se resuspendió en 200 µL de PBS y se adicionó 1.0 mL de buffer de lisis y se incubó en agitación. Posteriormente, se adicionó fenol:cloroformo:isoamilo (25:24:1), seguido de una purificación con cloroformo. La fase acuosa se precipitó con isopropanol y acetato de sodio, se incubó a -20 °C y se centrifugó a 4 °C. El pellet se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 50 µL de buffer TE 1X, almacenándose a -20 °C. En el caso de cultivos celulares, se retiró el medio y se desprendieron las células con tripsina. Tras centrifugación, el pellet se homogenizó en 750 µL de ZR Bashing Bead Buffer y se procesó con el kit Quick-DNA™ fecal/soil microbe miniprep (Zymo Research, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA total se obtuvo con TRIzol® Reagent (Invitrogen, USA). Para las muestras de semen, se emplearon 500 µL de semen diluido en crioprotector con lecitina de soya, a los que se adicionó 1 mL de TRIzol®, según el protocolo del fabricante. Para cultivos celulares (infectados y no infectados, con >80% de confluencia), se utilizó el contenido de un pozo de cultivo, tratado con 1 mL de TRIzol®. En ambos casos, el RNA extraído se almacenó a -70 °C. La síntesis de cDNA se realizó mediante retrotranscripción con el kit SuperScript First-Strand (Invitrogen, USA) en un volumen final de 21 µL, se usaron 50 ng de RNA y las concentraciones recomendadas de dNTPs, random hexamers, MgCl₂, DTT, RNaseOUT, SuperScript II RT y *E. coli* RNaseH. Las condiciones de incubación se aplicaron según las instrucciones del fabricante.

La calidad e integridad de DNA y RNA se verificaron mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000, Thermo Fisher, USA), electroforesis en gel de agarosa y amplificación de *β-actina* bovina por PCR punto final.

Estandarización de PCR

Con PCR de punto final, la detección de VDVB se realizó mediante amplificación del gen *E2*, se emplearon mezclas de reacción de 25 µL que incluyeron buffer 1X, dNTPs (0.16



mM), MgCl_2 en gradiente (1.0-3.0 mM), cebadores específicos (0.8 μM cada uno), Taq polimerasa (1.5 U) y DNA control (100 ng). Como controles se empleó cDNA de células MDBK infectadas (positivo) y DNA de células MDBK sanas (negativo). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 35 s, 58 °C por 45 s y 72 °C por 30 s, con una extensión final de 72 °C por 7 min. Para la detección de BoHV-1, se amplificó el gen *gB* con condiciones similares, con variaciones del gradiente de MgCl_2 (1.0-3.0 mM) y la temperatura de alineamiento (62-66 °C). Los productos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe, se usó marcador de 50 pb y buffer TAE 1X, y se visualizaron en un fotodocumentador. Los amplicones correspondientes a los fragmentos esperados se enviaron a secuenciar a Macrogen.

La estandarización de la qPCR simplex para la detección de VDVB evaluó dos condiciones de reacción. En la Opción A, la mezcla (20 μL) incluyó TaqMan Fast Advance Master Mix 1X, 100 nM de cada cebador del gen *E2*, 100 nM de sonda del gen *E2* y 300 ng de DNA. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 45 ciclos (94 °C por 1 min y 67 °C por 30 s). En la Opción B, la mezcla (20 μL) contenía TaqMan Fast Advance Master Mix 1X, 300 nM de cada cebador del gen *E2*, 180 nM de sonda del gen *E2* y 100 ng de DNA. Las condiciones de ciclado incluyeron una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos (94 °C por 1 min, 64 °C por 45 s y 72 °C por 30 s). Para BoHV-1, la reacción (20 μL) incluyó TaqMan Fast Advance Master Mix 1X, 300 nM de cada cebador del gen *gB*, 180 nM de sonda *gB* y 100 ng de DNA. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que la Opción B para VDVB. Los controles positivos y negativos en todos los ensayos simplex fueron DNA de células MDBK infectadas y sanas, respectivamente, y agua para el control sin plantilla (NTC).

Se estandarizaron ensayos de qPCR dúplex para la detección simultánea de cada virus y un control interno endógeno, el gen β -actina bovina. Para VDVB, se coamplificaron los genes *E2* y β -actina. Las reacciones se realizaron por triplicado en un volumen de 20 μL , se evaluaron gradientes en las concentraciones de oligonucleótidos y sondas. Se probaron las siguientes concentraciones: cebadores *E2* (300-900 nM), sonda *E2* (180-600 nM), cebadores β -actina (360-900 nM) y sonda β -actina (50-180 nM). Para el BoHV-1, se coamplificaron los genes *gB* y β -actina. La mezcla de reacción (20 μL) también se optimizó con gradientes de concentración: cebadores *gB* (300-900 nM), sonda *gB* (300-500 nM), cebadores β -actina (100-300 nM) y sonda β -actina (50-180 nM). En todos los ensayos dúplex se utilizaron controles positivos (gradientes de DNA de células infectadas, 100, 50 y 10 ng), controles negativos (gradientes equivalentes de DNA de células sanas) y agua para el NTC. Las condiciones de ciclado para ambos ensayos dúplex fueron idénticas: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos (94 °C por 1 min, 64 °C por 45 s y 72 °C por 30 s).

Análisis sanguíneo

Las muestras sanguíneas recolectadas junto con los eyaculados fueron analizadas mediante ELISA indirecta para la detección de VDVB y BoHV-1. Estos análisis fueron realizados en LIVE Laboratorio de Inmunología Veterinaria SA de CV (Jalisco, México), como método complementario de validación.

RESULTADOS

Los cultivos celulares de la línea MDBK ATCC CCL-22 se establecieron con éxito a partir del vial inicial, se generaron ocho frascos con los parámetros definidos en la metodología. Las células alcanzaron una confluencia superior al 80% en un periodo de 24 h (Figura 1a). La replicación de VDVB en células MDBK confluentes se llevó a cabo mediante la cepa no citopática ATCC-1561, sin observarse cambios morfológicos asociados a infección en ninguno de los cultivos (Figura 1b). En contraste, la infección con la cepa BoHV- ATCC-2181 1 mostró efecto citopático, con alteraciones morfológicas detectables a las 42 h posteriores a la inoculación (Figura 1c).

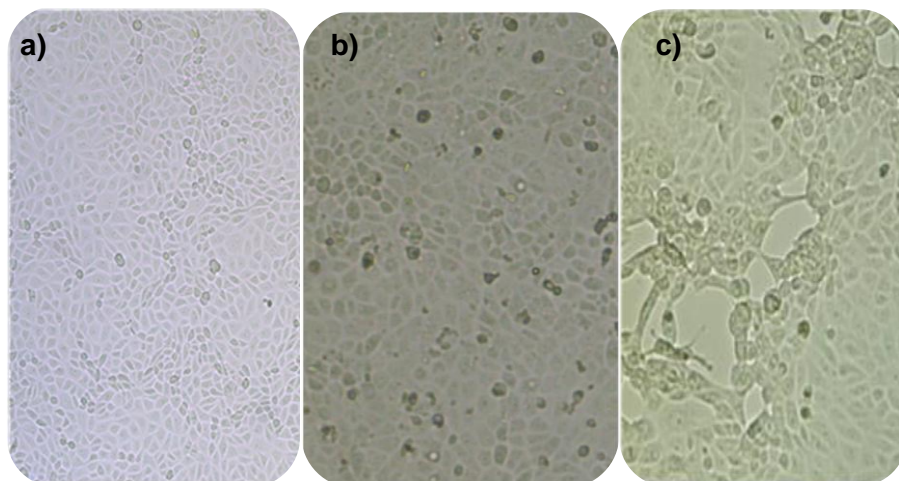


Figura 1. Cultivos de células MDBK ATCC CCL-22 observados en un microscopio invertido Leica DFC295 con cámara Leica S 40/0.45. a) Cultivo de células sanas con confluencia > al 80%, 24 h posterior al inicio de incubación. b) Cultivo de células con confluencia > al 80%, infectadas de VDVB ATCC-1561 NCP, 24 h después de la infección. c) Cultivo de células con confluencia > al 80%, 24 h después de la infección con la cepa BoHV-1 ATCC-2181.

Diseño de cebadores y PCR punto final

Las secuencias de cebadores y sondas diseñadas (Tabla 1) presentaron homología superior al 90% con secuencias de referencia en la base de datos GenBank, confirmada mediante BLAST. El análisis filogenético corroboró su pertenencia al mismo genotipo y a la especie bovina (*Bos taurus*), sin relación con otras especies.



Tabla 1. Secuencia de cebadores y sondas diseñadas para la detección de VDVb y BOHV

Patógeno	Cebador	Secuencias (5' → 3')	# of bases	
PCR punto final				
VDVB	E2_Fw	AGCCAAGGGACCGGTACTTC	20	
	E2_Rv	CACCCAACAAGGCGACCACT	20	
BoHV	gB_Fw	CACGTGAACACCATGTTTCAGC	21	
	gB_Rv	GCATCGAGTTCTCGATGAACAC	22	
<i>β-actina</i> bovina	Actb_Fw	ACTCGTACGTGGGGGATGAG	22	
	Actb_Rv	TCCATGTCTGTCCTCCAGTTGGTG	21	
PCR tiempo real	Sonda		Rep. 5'	Ext. 3'
VDVB	E2_P	GGGGGTGGCAATATTGGTTCGACCTG	ROX	
BoHV	gB_P	TACGACTCGTTCGCGCTCTCGACC	ROX	TAMRA
<i>β-actina</i> bovina	Actb_P	GGGGGTGGCAATATTGGTTCGACCTG	FAM	

La funcionalidad de los cebadores se validó mediante PCR de punto final, se amplificó el fragmento esperado de 130 pb del gen *E2* en DNA de células infectadas con VDVb, y de 110 pb del gen *gB* en condiciones de temperatura de alineamiento de 62 °C y gradiente de concentración de MgCl₂ (Figura 2).

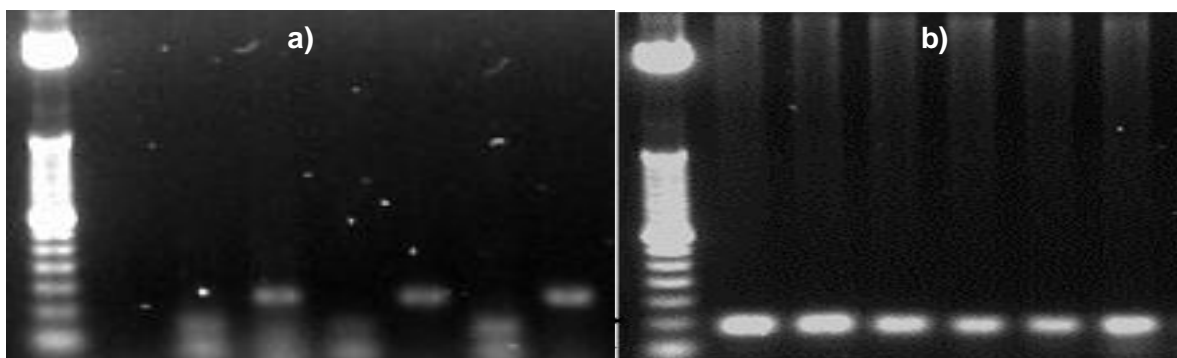


Figura 2. Amplificación por PCR en gel de agarosa al 2% y marcador de peso molecular de 50pb. a) gen *E2*, carril 1: control NTC; carriles 2, 4, 6: células MDBK infectadas con 1 µL de la cepa; carriles 3, 5, 7: células MDBK infectadas con 20 µL de la cepa. b) gen *gB*, carril 1-5: Tm de 62 °C y MgCl₂ de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM, respectivamente; carril 6: Tm de 64 °C y 1.0 mM de MgCl₂.

Ensayo de PCR en tiempo real

En los ensayos de PCR en tiempo real para VDVb, los parámetros óptimos se obtuvieron con 500 ng de iniciadores de *E2*, 360 ng de sonda de *E2*, junto con 500 ng de iniciadores de *β-actina* y 180 ng de su sonda correspondiente, a lo que se adicionó un total de 200 ng de DNA. En los controles positivos se observaron curvas de amplificación típicas de

los genes *E2* y β -actina, con valores de Ct >25 para β -actina y >30 para *E2* (Figura 3a). En los controles negativos únicamente se amplificó β -actina, mientras que en los controles NTC no se detectó amplificación (Figura 3b).

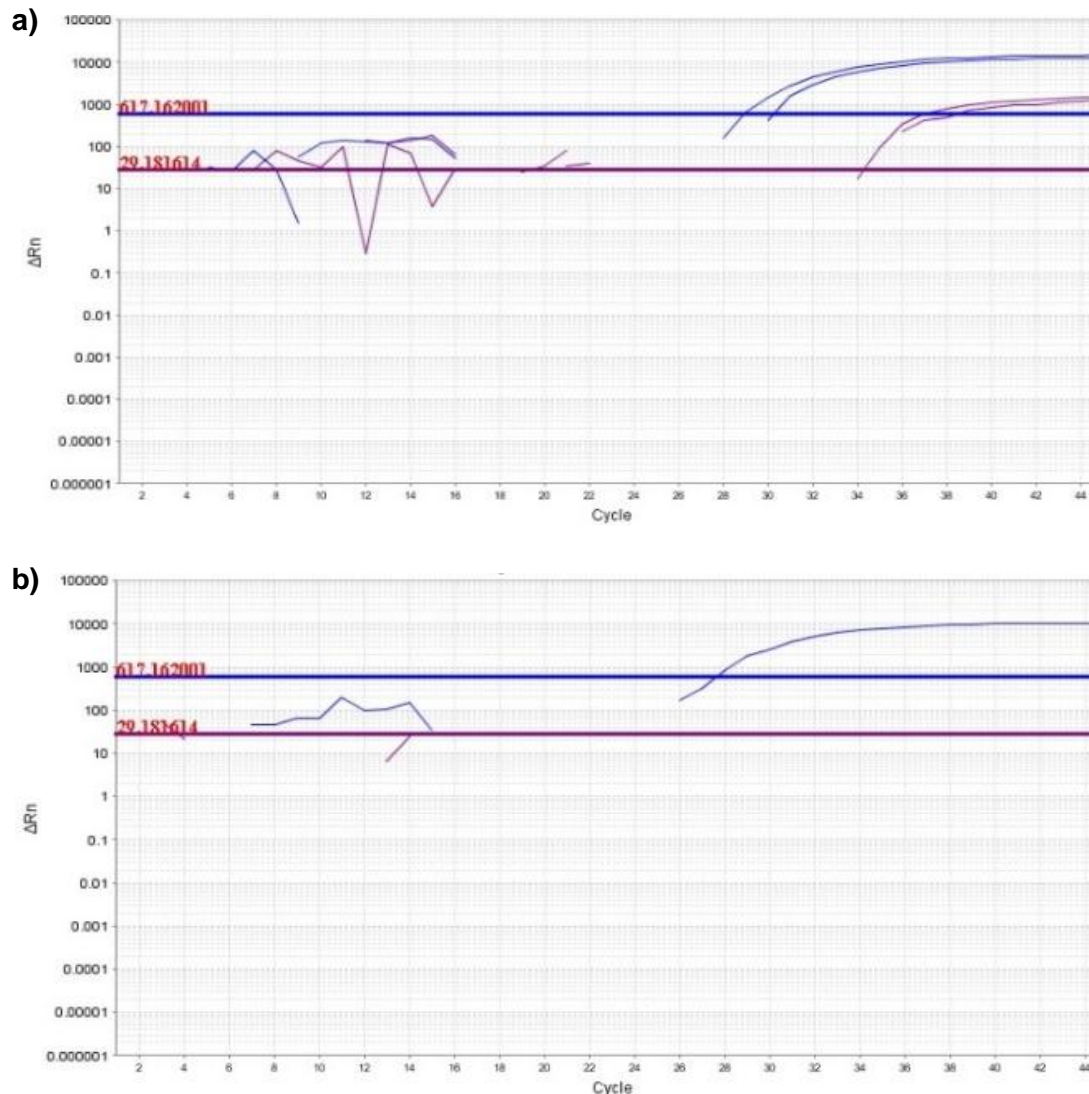


Figura 3. Graficas de amplificación para la detección de VDVB. a) genes *E2* (morado) y β -actina (azul) en controles positivos. b) β -actina (azul) en control negativo.

El análisis de DNA de semen bovino criopreservado mostró amplificación del gen β -actina en cinco muestras, con valores de Ct >25, mientras que el gen *E2* no se detectó en ninguna muestra, con amplificación únicamente en el control positivo (Figura 4, Tabla 2).

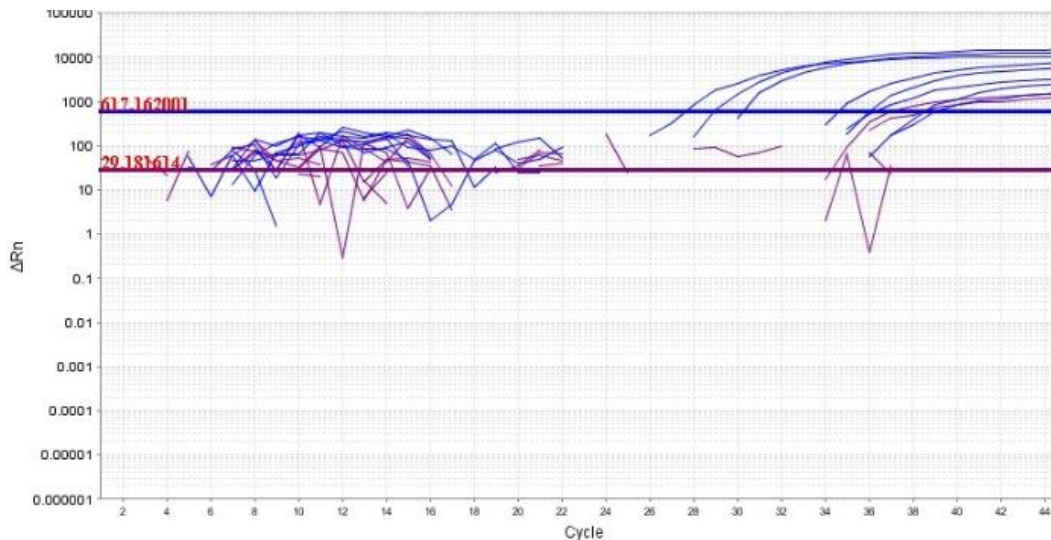


Figura 4. Graficas de amplificación para la detección de VDV-B en semen bovino. Amplificación de los genes *E2* (morado) y *β-actina* (azul).

Tabla 21. Valores Ct (PCR tiempo real) para cada gen amplificado en muestras de semen bovino para la detección de VDV-B y resultado de diagnóstico por ELISA

Id. de animal	No. de DNA	Ct <i>β-actina</i>	Ct <i>E2</i>	Dx por ELISA
2753	1	35.8	No amplificó	Negativo
8215	2	34.6	No amplificó	Positivo
9106	3	36.0	No amplificó	Negativo
1622	4	35.9	No amplificó	Negativo
\bar{x}		35.58	-	
s		0.66	-	
C.V		1.84%	-	
CRBIVDV-B	CP	29.0	35.2	-
CRBSI	CN	27.5	No amplificó	-
	NTC	No amplificó	No amplificó	-

CRBIVDV-B: células de riñón bovino infectadas con VDV-B; CRBSI: células de riñón bovino sin infectar; \bar{x} : media; s: desviación estándar; C.V: coeficiente de variación.

En el caso de BoHV-1, los parámetros óptimos se alcanzaron con 600 ng de iniciadores del gen *gB*, 400 ng de su sonda, 100 ng de iniciadores de *β-actina* y 50 ng de su sonda, con una concentración de 20 ng de DNA. Los controles positivos presentaron amplificación de los genes *gB* y *β-actina* con curvas típicas y valores de Ct >25 para *β-*

actina y >20 para *gB* (Figura 5a). En los controles negativos se amplificó únicamente β -*actina*, mientras que en los controles NTC no se observó amplificación (Figura 5b).

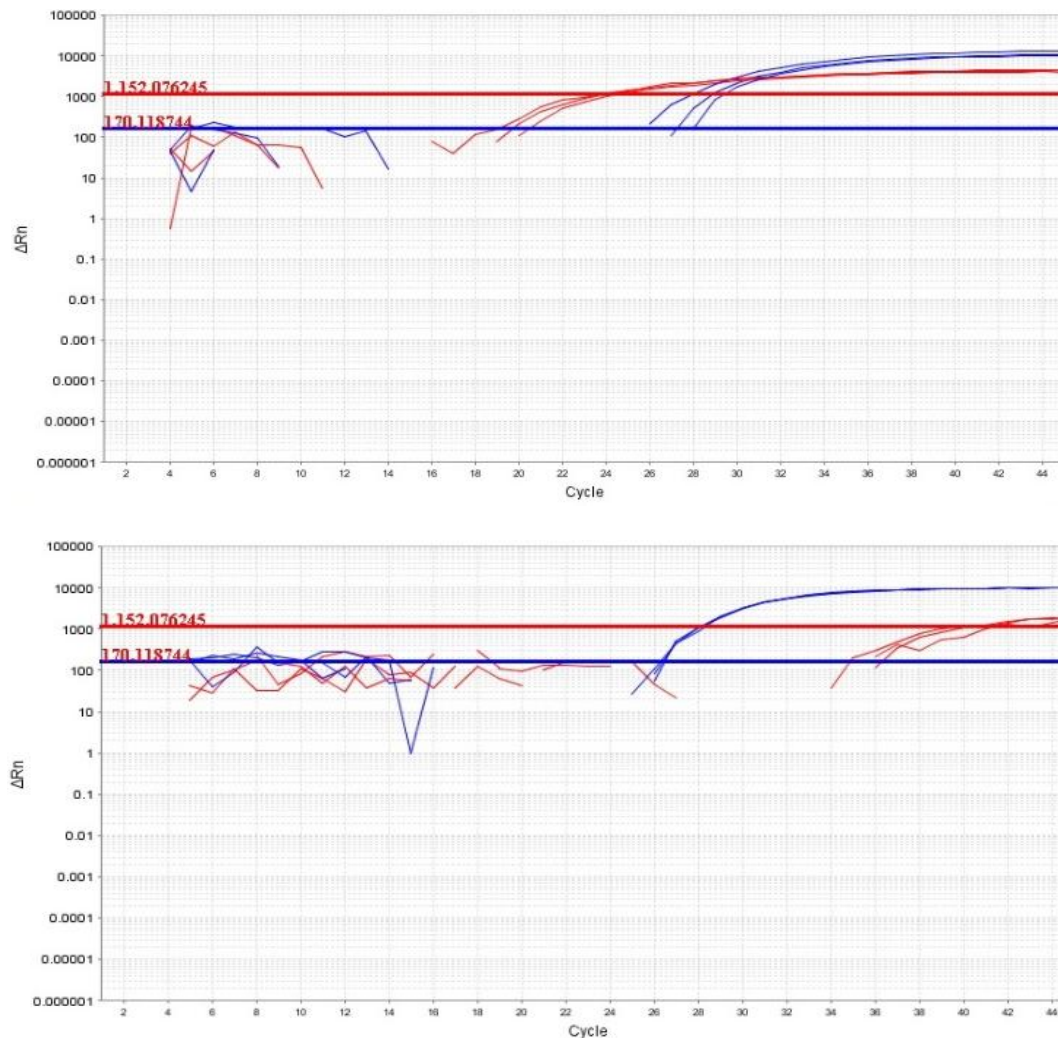


Figura 5. Graficas de amplificación para la detección de BoHV-1. a) genes *gB* (rojo) y β -*actina* (azul) en controles positivos. b) gen β -*actina* (azul) en control negativo

El análisis de DNA de semen bovino criopreservado mostró amplificación de β -*actina* en cinco muestras, con valores de $Ct >25$, mientras que el gen *gB* no se detectó en ninguna muestra, con amplificación exclusiva en el control positivo (Figura 6, Tabla 3).

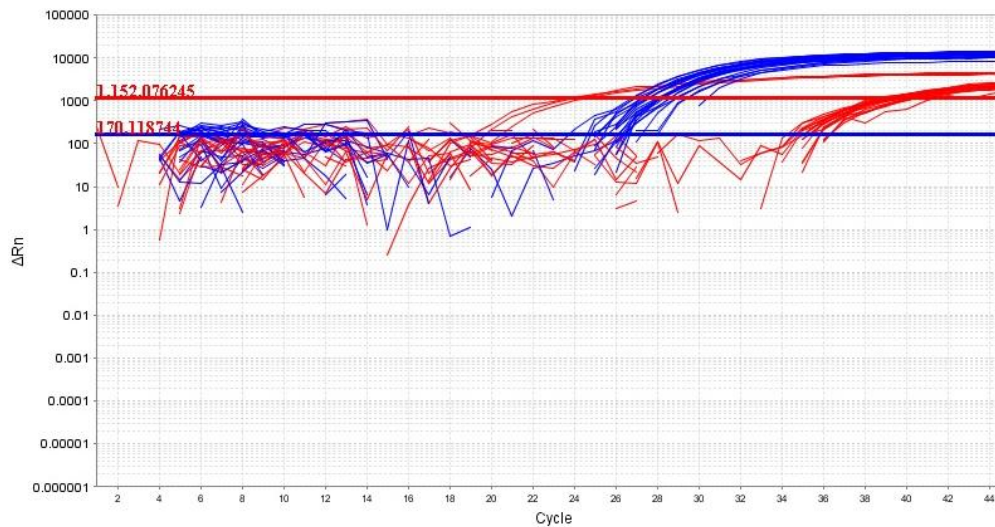


Figura 6. Grafica de amplificación para la detección de BoHV-1 en semen bovino. Amplificación de los genes *gB* (rojo) y *β-actina* (azul).

Tabla 32. Valores Ct (PCR tiempo real) para cada gen amplificado en muestras de semen bovino para la detección de BoHV-1 y resultado de diagnóstico por ELISA

Id de animal	No. de DNA	Ct <i>β-actina</i>	Ct <i>gB</i>	Dx por ELISA
8659	1	25.1	No amplificó	Negativo
8215	2	33.3	No amplificó	Positivo
Censo	3	26.5	No amplificó	Negativo
Censo	4	27.5	No amplificó	Negativo
Censo	5	25.6	No amplificó	Negativo
9106	6	26.3	No amplificó	Negativo
5742	7	25.9	No amplificó	Positivo
6711	8	26.6	No amplificó	Positivo
1622	9	23.4	No amplificó	Positivo
8659	10	25.3	No amplificó	Positivo
\bar{x}		26.55	-	
s		2.61	-	
C.V		9.84%	-	
CCRBIBoHV		28.0	24.0	-
CCRBSI		26.1	No amplificó	-

CCRBIBoHV: células de riñón bovino infectadas con BoHV; CCRBSI: células de riñón bovino sin infectar; \bar{x} : media; s: desviación estándar; C.V: coeficiente de variación.



DISCUSIÓN

El VDVB y el BoHV-1 son virus que causan elevada morbilidad en el ganado bovino. Aunque la mortalidad asociada a BoHV-1 se ha estimado entre 0 y 15%, la de VDVB puede alcanzar o superar el 25%, con incrementos notables en casos de enfermedad de las mucosas (Grünberg, 2021). En México, la seroprevalencia reportada para BoHV-1 supera el 50% en regiones del centro y la península, mientras que para VDVB varía entre 30 y 76.5% en distintas zonas del país, con registros del 100% en el sur (Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2021). Estos datos reflejan la amplia distribución de ambos virus y explican su impacto en la productividad ganadera, dado que las consecuencias incluyen abortos, infertilidad en hembras y machos, y disminución general del rendimiento (Rimayanti *et al.*, 2024). Los machos representan uno de los principales diseminadores, ya sea tras infecciones agudas o en condición de infección persistente en el caso del VDVB. En estos animales se ven afectadas la vesícula seminal y la glándula prostática, lo que compromete la calidad sanitaria del semen (Oguejiofor *et al.*, 2019). Por ello, resulta fundamental implementar pruebas diagnósticas específicas en semen bovino fresco y criopreservado (Rimayanti *et al.*, 2024).

Diversos métodos han sido empleados para la detección de estos patógenos, entre los que se incluyen ELISA, PCR y amplificación mediada por polimerasa recombinasa (RPA), aplicados a muestras de sangre, suero, hisopados nasales y anales, tejidos y heces (Hou *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2024). No obstante, la comercialización de semen criopreservado se asocia a una movilización de muestras que en la mayoría de los casos solo cumplen con análisis sanitarios básicos, lo que aumenta el riesgo de diseminación de enfermedades. En este contexto, el semen criopreservado debe considerarse una muestra prioritaria para el diagnóstico. Aunque la RPA ofrece rapidez (<40 min), la PCR en tiempo real se mantiene como la técnica de mayor especificidad ($\approx 100\%$) y sensibilidad ($\sim 97\%$) para la detección de BoHV-1 en semen bovino. De hecho, se ha señalado que la PCR constituye el método ideal para la detección de ambos patógenos en este tipo de muestra (Chatterjee *et al.*, 2016; El-Mohamady *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2024).

En el presente estudio, los genes seleccionados (*E2* para VDVB y *gB* para BoHV-1) están asociados a factores de virulencia y se han empleado en ensayos diagnósticos con buenos resultados. Adicionalmente, se incorporó el gen de β -actina bovina como control endógeno, para asegurar que las amplificaciones correspondieran a material genético bovino. Se consideró positiva toda muestra con valores de Ct >25 para β -actina, >30 para *E2* y >20 para *gB*. Estos parámetros concuerdan con el estudio de El-Mohamady *et al.* (2020), quienes establecieron Ct <40 para la detección de VDVB y BoHV-1, o el de Soltan *et al.* (2015), que fijaron Ct >30 para *E2*. En el presente trabajo se logró la amplificación de los tres genes en los controles positivos y únicamente de β -actina en los controles negativos, lo que confirma la confiabilidad del sistema. Los ensayos de PCR en tiempo real mostraron 100% de muestras negativas para VDVB y



BoHV, en contraste con resultados positivos obtenidos por ELISA, lo que sugiere posibles falsos positivos en esta última técnica. Estos hallazgos indican que el semen bovino analizado no constituye una fuente de diseminación de los virus bajo las condiciones de este estudio, aunque la ausencia de detección debe interpretarse con cautela debido al número de muestras. Por lo que se plantea a futuro ampliar el muestreo y validar protocolos moleculares para semen bovino, para fortalecer las medidas de bioseguridad en inseminación artificial y bancos de germoplasma.

CONCLUSIONES

La diseminación de VDVB y BoHV a través de semen bovino criopreservado es un riesgo para la sanidad y productividad ganadera. Los resultados de este estudio demuestran que la metodología empleada es una herramienta útil para la detección de estos patógenos en material seminal, lo que contribuye a fortalecer la vigilancia epidemiológica y podría respaldar estrategias orientadas hacia su control y erradicación en México.

LITERATURA CITADA

- ABAD-ZAVALA J, Ríos-Utrera A, Rosete-Fernández JV, García-Camacho A, Zárate-Martínez JP. 2016. Prevalencia de rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en hembras en tres épocas del año en la Zona Centro de Veracruz. *No. Scien.* 8(16):213-227. <https://novascientia.lasallebajio.edu.mx/ojs/index.php/novascientia/issue/view/16>
- AL-KUBATI AAG, Hussen J, Kandeel M, Al-Mubarak AIA, Hemida MG. 2021. Recent advances on the bovine viral diarrhoea virus molecular pathogenesis, immune response, and vaccines development. *Front. Vet. Sci.* 8:e665128. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.665128>
- BACHOFEN C, Braun U, Hilbe M, Ehrensperger F, Stalder H, Peterhans E. 2010. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet. Microbiol.* 141:258-267. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.022>
- BETTINI A, Stella M, Precazzini F, Degaspero M, Colorio S, Tavella A. 2023. Infectious bovine rhinotracheitis post-eradication program in the autonomous province of Bolzano, Italy: a retrospective study on potential bovine herpesvirus type 2 Cross-Reactivity. *Animals.* 13(22):e3502. <https://doi.org/10.3390/ani13223502>
- CHASE CCL, Fulton RW, O'Toole D, Gillette B, Daly RF, Perry G, Clement T. 2017. Bovine herpesvirus 1 modified live virus vaccines for cattle reproduction: Balancing protection with undesired effects. *Vet. Microbiol.* 206:69-77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.016>
- CHATTERJEE A, Bakshi S, Sarkar SN, Mitra J, Chowdhury S. 2016. Bovine herpes virus-1 and its infection in India-a review. *Indian J. Anim. Health.* 55(1):21-40.



https://www.ijah.in/archive_article/50

CHOTHE SK, Sebastian A, Thomas A, Nissly RH, Wolfgang D, Byukusenge M, Mor SK, Goyal SM, Albert I, Tewari D, Jayarao BM, Kuchipudi SV. 2018. Whole-genome sequence analysis reveals unique SNP profiles to distinguish vaccine and wild-type strains of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1). *Virology*. 522:27-36.

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.06.015>

COLITTI B, Nogarol C, Giacobini M, Capucchio MT, Biasato I, Rosati S, Bertolotti L. 2019. Compartmentalized evolution of bovine viral diarrhoea virus type 2 in an immunotolerant persistently infected cow. *Sci Rep*.9:e15460.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52023-w>

D'OFFAY JM, Eberle R, Fulton RW, Kirkland PD. 2016. Complete genomic sequence and comparative analysis of four genital and respiratory isolates of bovine herpesvirus subtype 1.2b (BoHV-1.2b), including the prototype virus strain K22. *Arch. Virol*. 161:3269-74. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3026-1>

EL-MOHAMADY RS, Behour TS, Rawash ZM. 2020. Concurrent detection of bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 in bulls' semen and their effect on semen quality. *Int. J. Vet. Sci. Med*. 8(1):106-114.

<https://doi.org/10.1080/23144599.2020.1850197>

GREEN M, and Sambrook J. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. ISBN: 978-1-936113-42-2.

GRÜNBERG W. 2021. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease complex. MSD Manual Veterinary Manual, Germany. <https://www.msddvetmanual.com/infectious-diseases/bovine-viral-diarrhoea/bovine-viral-diarrhoea-and-mucosal-disease-complex>

GUTIÉRREZ-HERNÁNDEZ J, Palomares-Resendiz G, Hernández-Badillo E, Leyva-Corona J, Díaz-Aparicio E, Herrera-López E. 2020. Frecuencia de enfermedades de impacto reproductivo en bovinos de doble propósito ubicados en Oaxaca, México. *Abanico Vet*. 10:e114. <https://doi.org/10.21929/abavet2020.22>

HOU P, Wang H, Zhao G, He C, He H. 2017. Rapid detection of infectious bovine *Rhinotracheitis* virus using recombinase polymerase amplification assays. *BMC Vet. Res*. 13:e386. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1284-0>

ISCARO C, Cambiotti V, Petrini S, Feliziani F. 2021. Control programs for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in European countries: An overview. *Anim. Health Res. Rev*. 22:136-146. <https://doi.org/10.1017/s1466252321000116>

JIA S, Huang X, Li H, Zheng D, Wang L, Qiao X, Jiang Y, Cui W, Tang L, Li Y, Xu Y. 2020. Immunogenicity evaluation of recombinant *Lactobacillus casei* W56 expressing



bovine viral diarrhea virus E2 protein in conjunction with cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Microb. Cell Fact.* 19:e186. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01449-3>

JIANG L, Zhang G, Wang P, Niu X, Liu Q, Zhang S, Gao W, Li Y. 2024. Simultaneous detection of bovine viral diarrhea virus (BVDV) and bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) using recombinase polymerase amplification. *Sci. Rep.* 14:e10169. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56869-7>

LARGHI M. 2018. Comparative study in the control of bovine viral diarrhea. *Anim. Health Res. Rev.* 19:125-133. <https://doi.org/10.1017/S1466252318000129>

LIN J, Chen RH, Yang MJ, Zhu YM, Xue F. 2021. Isolation and molecular characterization of bovine herpesvirus 4 from cattle in mainland China. *Arch. Virol.* 166(2):619-626. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04896-w>

LIU CY, Guo H, Zhao HZ, Hou LN, Wen YJ, Wang FX. 2022. Recombinant bovine herpesvirus type I expressing the bovine viral diarrhea virus E2 protein could effectively prevent infection by two viruses. *Viruses.* 14(8):e1618. <https://doi.org/10.3390/v14081618>

NETTLETON P, Russell G. 2017. Update on infectious bovine rhinotracheitis. *In Pract.* 39(6):255-272. <https://doi.org/10.1136/inp.j2226>

OGUEJIOFOR CF, Thomas C, Cheng Z, Wathes DC: 2019. Mechanisms linking bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection with infertility in cattle. *Anim. Health Res. Rev.* 20(1):72-85. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000057>

RIMAYANTI R, Khairullah AR, Lestari TD, Moses IB, Utama S, Damayanti R, Mulyati S, Raharjo HM, Kusala MKJ, Raissa R, Wibowo S, Abdila SR, Fauzia KA, Yanestria SM, Fauziah I, Siregar JE. 2024. Infectious bovine rhinotracheitis: Unveiling the hidden threat to livestock productivity and global trade. *Open Vet. J.* 14(10):2525-2538. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i10.3>

SOLTAN MA, Wilkes RP, Elsheery MN, Elhaig MM, Riley MC, Kennedy MA. 2015. Circulation of bovine viral diarrhea virus-1 (BVDV-1) in dairy cattle and buffalo farms in Ismailia Province, Egypt. *J. Infect. Dev. Ctries.* 9(12):1331-1337. <https://doi.org/10.3855/jidc.7259>

WANG Y, Pang F. 2024. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus: an overview of currently available methods. *Front. Microbiol.* 15:e1370050. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1370050>

WELLENBERG GJ, Verstraten ER, Belak S, Verschuren SBE, Rijsewijk FAM, Peshev R, Van-Oirschot JT. 2001. Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *J. Virol. Methods.* 97:101-112. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(01\)00341-x](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(01)00341-x)