

ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA RT-PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PESTE PORCINA CLÁSICA EN VENEZUELA.

Virla, J., Aranguren, J.A., Portillo, M.G., Quintero-Moreno, A., Zapata, D., Fernández J., Trujillo, M. y Mejía-Silva W.

Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. E-mail: willian.mejia@fcv.luz.edu.ve

INTRODUCCIÓN

La Peste porcina clásica (PPC), también conocida como cólera porcino o fiebre porcina clásica, es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a los cerdos domésticos y salvajes de todas las edades, que se caracteriza por producir lesiones de tipo hemorrágico en múltiples órganos en los animales susceptibles, provocando una alta morbilidad y mortalidad en las granjas afectadas (Le Potier *et al.*, 2006). El virus de la peste porcina clásica (VPPC) es el agente causal de la PPC, este virus pertenece al género *Pestivirus* y a la familia *Flaviviridae* (Arias *et al.*, 2003), el cual incluye también al virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y al de la enfermedad de la frontera (EF). Estos virus guardan una estrecha relación genómica, por lo que son muy parecidos estructural y antígenicamente con el virus de la PPC.

La PPC ha sido descrita en diferentes partes del mundo en donde la producción de los cerdos es importante. En Venezuela la enfermedad fue descrita por primera vez en 1941, desde entonces se presenta de forma endémica (Rolo *et al.*, 2004). En el año 1998 se estableció un programa de control y erradicación de la PPC, sin embargo, hasta el momento no se ha podido cumplir con las metas establecidas. Un estudio realizado por Rolo *et al.* (2004) concluyen que el virus de la PPC se encuentra activo en Venezuela y que los porcentajes de vacunación son muy bajos.

Desde el año 1941 hasta el presente, el diagnóstico de la PPC en Venezuela es realizado por laboratorio oficial (CENIAP/INIA) utilizando la técnica de inmunofluorescencia directa (Rolo *et al.*, 2004). Recientemente se han implementado técnicas moleculares como la reacción en cadena por la polimerasa- transcripción reversa (RT-PCR) para el diagnóstico de la PPC (Escatel *et al.*, 2003; Harding *et al.*, 1994; Risatti *et al.*, 2003). Sin embargo, en Venezuela no se ha desarrollado la metodología de tipo molecular para el diagnóstico de la PPC, por lo cual, el objetivo de este trabajo fue estandarizar la técnica de RT-PCR para la detección del virus de la PPC en Venezuela.

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus y extracción de ARN viral.

La extracción del ARN total se realizó a partir de una vacuna comercial contra la PPC (control positivo) con una concentración de $10^{2.5}$ TCDI₅₀/ml de la cepa China adaptada a cultivo celular (FORT DODGE, SAÚDE ANIMAL LTDA.- Campinas, Brazil) y de tejidos (tonsilas, nódulos linfáticos, riñón, bazo, sangre) procedente de cinco cerdos inoculados experimentalmente (cepa Maracay) utilizando el reactivo de TRIZOL[®] (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA).

Reacción en cadena de la polimerasa -transcripción reversa- (RT-PCR).

La RT-PCR se diseñó utilizando los iniciadores descritos por Agüero *et al.* (2004). Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de un tamaño de 108 pares de bases (pb) a partir de una sección conservada de la región no codificante del extremo 5' del genoma viral (5'-NTR). Para la realización de la prueba RT-PCR se utilizó un kit comercial ONE STEP RT-PCR KIT (Qiagen GMBH, Hilden, Alemania). Para medir la efectividad de la reacción, se realizó análisis electroforético de 10 µl del producto amplificado en geles de agarosa al 2 % conteniendo 0,5 µg/ml bromuro de etidio.

Sensibilidad y Especificidad.

Para determinar la sensibilidad de la técnica se realizaron diluciones décuples a partir de la cepa vacunal. La prueba de especificidad se realizó mediante el análisis del genoma viral de otro miembro del género *Pestivirus* como es el virus de la Diarrea Viral Bovina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de validar y estandarizar una prueba molecular para el diagnóstico de la PPC en Venezuela, se realizaron una serie de pruebas confirmatorias de la factibilidad de

aplicar esta técnica de diagnóstico molecular. A partir de la cepa vacunal y de los tejidos procedentes de los animales inoculados experimentalmente se amplificó el producto esperado de 108 pb (Fig. 1, columna 1). En el ensayo de sensibilidad se pudo obtener un producto de amplificación visible hasta la muestra extraída de 250 μ l de la dilución 10^{-1} correspondiente a una concentración de $10^{1.5}$ TCDI₅₀/ml (Fig. 1, columna 5), Lo que indica que bajo las condiciones establecidas, la técnica de RT-PCR fue capaz de detectar hasta 0,32 partículas infectivas mínimas por ensayo de RT-PCR. En cuanto a la especificidad, no se obtuvo ningún producto amplificado de la cepa del VDVB (Figura 1, columna 8). Estos resultados son similares a los descritos por Agüero *et al.* (2004) donde destacan la alta sensibilidad de la prueba para detectar el VPPC en muestras procedente de animales inoculados experimentalmente. La similitud de los resultados de sensibilidad y especificidad implica un excelente desempeño de los cebadores.

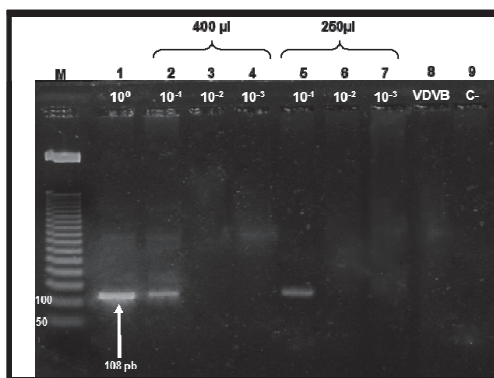


Figura 1. Resultados de la prueba de sensibilidad y especificidad para la detección del VPPC. M: marcador de peso molecular (50bp dna step ladder from promega, madison, wisconsin). Línea 1: suspensión de la cepa viral con una concentración de $10^{2.5}$ tcdi₅₀/ml. Línea 2-7: diluciones del virus de la PPC. Línea 8: cepa del VDVB. Línea 9: control negativo.

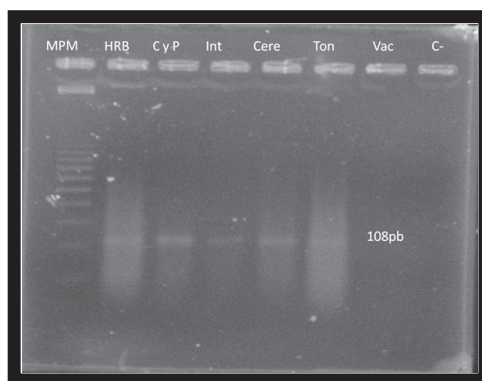


Figura 2. Resultado de la amplificación de ARN viral de las muestras de tejidos. MPM: marcado de peso molecular (50bp dna step ladder from promega, madison, wisconsin). HRB: hígado, riñón, bazo. C y P: corazón y pulmón. Int: intestino. Cere: cerebro. Ton: tonsila. Vac: vacuna como control positivo. C-: control negativo de la PCR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agüero, M., Fernández, J., Romero, I., Zamora, M., Sanchez, C., Belak, S., Arias, M., Sanchez-Vizcaino, J. 2004. *J. Clin. Microbiol.* (41):4430-4434. • Arias, M., Romero, I., Gómez-Villamandos, J.C., Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2003. [Http://www.sanidadanimal.info/inmuno/inicio.htm](http://www.sanidadanimal.info/inmuno/inicio.htm). • Escatel, G.S., Varga, F.D., Salas, E.C., García, M., Díaz, C.A., González, A.M. 2003. *Téc. Pecu. Méx.* 41(1):105-110. • Harding, M., Lutze-Wallace, C., Pru'dhomme, J., Zhong, X., Jerzy, R. 1994. *J. Clin. Microbiol.* 32(10):2600-2602. • Le Potier, M.F., Mesplede, A., Vannier, P. 2006. *Diseases of Swine* 9th edition, Barbara E. Straw (editor). Iowa State University press Ames. Iowa. U.S.A. Pp 309-322. • Risatti, R.G., Callahan, J.D., Nelson, W.M., Borca, M.V. 2003. *J. Clin. Microbiol.* 41(1):500-505. 2003. • Rolo, M., Clavijo, A. & Alfaro, C. 2004. *Revista digital CENIAP hoy*. Número especial. Maracay, Aragua, Venezuela. http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/ne/arti/rolo_m/arti/rolo_m.htm.

STANDARDIZATION OF RT-PCR TEST FOR DIAGNOSIS OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS IN VENEZUELA

ABSTRACT: Classical swine fever (CSF) is a highly contagious viral disease affecting domestic and wild swine of all the ages, characterized by hemorrhagic lesions in multiple organs in susceptible pigs. In Venezuela, CSF was firstly described in 1941, since then, it is considered endemic. Diagnosis is done with direct immunofluorescence (IF) and molecular technology for CFS diagnosis has not been implemented. The aim of this trial was to establish and standarize the RT-PCR test in order to have an additional confirmatory test for CFS. Since the vaccine strain and tissue from animals experimentally inoculated amplified the expected product of 108 bp, corresponding to an 5-NTR gene fragment. In sensitivity test the RT-PCR technique was able to detect up to 0.32 minimum infective particles by RT-PCR assay. Regarding the specificity, no amplified product obtained from any strain of Bovine Viral Diarrhea. Because RT-PCR is highly sensitive, easy to perform and provides rapid results, it can be used as a complementary classical swine fever diagnostic test

Keywords: classical swine fever, diagnosis, RT-PCR.