

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE PCR PARA DIAGNOSTICO DE CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2

¹García-Reyna, P.B., ²Rodríguez, R. A., ¹Vargas, C. V. ²Mercado, P. M., ²Batalla, C. D., ¹Quintero, R.V. y ¹García, C.L.A.

¹ Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM ² CENASA-SAGARPA.

INTRODUCCIÓN.

En México existen reportes de la infección por Circovirus Porcino tipo 2 (PCV-2) asociada al Síndrome Multisistémico y de Adelgazamiento Postdestete (PMWS)¹. Desde el punto de vista clínico el diagnóstico diferencial con otras enfermedades puede ser muy extenso, en este sentido las lesiones histopatológicas características del tejido linfóide orientan mucho el diagnóstico. Sin embargo el diagnóstico preciso se debe acompañar con la detección del virus en los tejidos de los cerdos afectados. El tejido linfóide es de elección para detectar el PCV-2, donde el virus puede estar presente en cantidades variables dependiendo de grado de infección.

Para detectar al PCV-2 en tejidos se han desarrollado métodos que permiten correlacionar la presencia del virus con la presencia de lesiones. A este respecto las técnicas de Hibridación *in situ*, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la inmunohistoquímica son utilizadas ampliamente para determinar la presencia de ADN viral o sus proteínas ya sea en el citoplasma de histiocitos, células gigantes multinucleadas y algunas líneas de macrófagos entre otras células.

OBJETIVOS.

El objetivo de este trabajo fue el de estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección del PCV-2 a partir de muestras de tejidos de cerdo congelados.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Durante la estandarización se utilizó como control una muestra de tejido linfóide de cerdo de destete PCV-2 identificado como positivo por Hibridación *in situ* (Segalés, 2003, datos no reportados). Otras muestras utilizadas en la estandarización provienen de dos casos clínicos de tejidos de cerdos sugestivos de ser infectados por el PCV-2 de acuerdo a los criterios histológicos reportados por Rosell y cols (1999).

El tejido linfóide, pulmón y riñón de muestras mencionadas se maceraron y se digirieron con Proteinasa K durante 3 horas a 50°C. La extracción del ADN se realizó con cloroformo-fenol y la precipitación con etanol.

En el presente trabajo se utilizaron los oligonucleótidos PCV-7 y PCV-10 reportados por Rosell en 1999. El volumen de reacción de amplificación se llevó a 30 µl el cual constó de TAq polimerasa con 1.25 U, buffer para PCR 1x, Cloruro de magnesio 1.5 mM, una mezcla de dNTP's 200 µM y 0.5 µM de cada oligonucleótido. La amplificación del producto se

desarrolló en un termociclador Perkin Elmer y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C, 3 minutos y 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 58°C, 1 min y 72°C, 1.30 seg. Para finalizar 5 min de extensión a 72°. El producto de amplificación se reveló en geles de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio y la observación de los resultados se reveló en un transiluminador con luz UV.

RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en el gel de agarosa mostraron un producto de amplificación de aprox 400 pares de bases, lo que coincide con el tamaño esperado según lo reportado por Rosell y cols. (1999).

DISCUSIÓN.

Un punto en discusión en la identificación del PCV-2 por PCR es la similitud que tiene su secuencia con la secuencia del PCV-1, el cual pertenece a la misma familia y es un contaminante identificado en células PK-15. En una amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos antes mencionados se obtienen productos semejantes para el PCV-2 (428 pares de bases) y para el PCV-1 (418 pb). Para resolver estas diferencias es posible analizar los productos amplificados en ensayos de digestión enzimática utilizando endonucleasas como la *Hae* III y *Hha* I las cuales cortan en sitios específicos que permiten diferenciar entre PCV-1 y PCV-2 respectivamente³.

Por otro lado la utilización del PCR para el diagnóstico del PCV-2 no es necesariamente suficiente. Es necesario también desarrollar métodos de PCR cuantitativos que diferencien las presentaciones clínicas de los cuadros subclínicos.

CONCLUSIONES.

Los métodos moleculares son una herramienta muy útil en el diagnóstico ya que permiten identificar con mayor especificidad la presencia de un agente infeccioso. El análisis de casos clínicos en campo sospechosos a la infección por el PCV-2 será una herramienta útil para reconocer la evolución de esta enfermedad en nuestro país.

¹Trujano y cols. (2001) Vet Rec. Jun 23, 148 (25) 792; ² Segalés, J. y Domingo, M. (2002) Vet. Quart.:109-124. ³ Rosell C. y cols. (1999) J.Comp. Path. 120;59-78.