

INTRODUCCIÓN

Actualmente, el diagnóstico específico de enfermedades infecciosas es prioritario para la implementación de programas de control y prevención. La hibridación *in situ* (HIS) es una prueba diagnóstica de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades virales debido a su alta especificidad y sensibilidad lo cual ha permitido que la técnica sea utilizada no solo en laboratorios de investigación sino también en laboratorios diagnósticos rutinarios. En teoría, la detección de ácido nucleico viral puede ser detectado incluso en estados de latencia viral debido a su alta sensibilidad. Lo anterior puede ser logrado mediante el uso de sondas de ácido nucleico dirigidas a genes que son abundantes durante replicación viral y que son transcritos con alta frecuencia. La sensibilidad de la HIS también depende del tipo de sonda de ácido nucleico empleada para la detección del agente infeccioso. Actualmente, las sondas más empleadas son oligonucleótidos sintético (oligosondas), sondas de RNA de cadena simple (ribosondas) y DNA complementario (cDNA) generado mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos son utilizados para la detección de mRNA y su eficiencia se incrementa cuando los mensajes se encuentran con abundancia. Tienen la ventaja de que su producción automatizada y el marcaje son sencillos y económicos. Debido a su reducido tamaño penetran en los tejidos con facilidad pero a su vez le proporciona una menor eficiencia de marcaje disminuyendo la sensibilidad de la detección misma que puede ser mejorada si se usan mezclas de diferentes oligonucleótidos en cada HIS. El presente trabajo describe una técnica de HIS para la detección de rubulavirus porcino mediante el uso de oligosondas.

MATERIAL Y MÉTODOS

La validación del protocolo de HIS para la detección de rubulavirus porcino se realizó utilizando una mezcla de 4 oligonucleótidos sintéticos específicos de 24 bases de los genes M y P marcados previamente con digoxigenina. Los cuales fueron diseñados a partir de las secuencias publicadas utilizando el programa de software Primer2 (Scientific & Educational Software, Durham, NC) y los criterios empleados para el diseño de las sondas fueron: % de GC mínimo 50 y máximo 60, T_m °C mínima 55, máxima 80, no hairpins, ausencia de dímeros 3', ausencia de secuencias repetidas de GC a nivel 3' (GC runs). La HIS se realizó en la minillas Probe On Plus (Fisher Scientific, Pittsburg, USA) utilizando una estación de trabajo (Fisher Microprobe) siguiendo el protocolo convencional (Roche,) con tiempos de hibridación de 60 minutos a 37° C seguida de lavados de alta astringencia con solución amortiguadora de citrato de sodio para la

aplicación de anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina durante 45 minutos a 37° C. Las muestras fueron reveladas con azul-nitro tetrazolio y BCIP y contracoloradas con hematoxilina de Harris. El protocolo descrito fue estandarizado con controles positivos cultivos celulares PK-15 infectados con el rubulavirus porcino por 5 días y tejidos de cerdos infectados experimentalmente a los 3 días de edad. Los controles negativos fueron muestras de tejidos de cerdos libres de rubulavirus porcino y muestras positivas a la enfermedad de Newcastle (rubulavirus aviar), las cuales se utilizaron paralelamente como controles de especificidad.

RESULTADOS

Se determinó que la mezcla de oligonucleótidos empleada pudo detectar el rubulavirus en los controles positivos de cultivos celulares y de muestras de tejidos de encéfalo sin observarse reacción positiva en los controles negativos. Se pudo determinar la especificidad de los oligonucleótidos porque ninguna de las muestras de rubulavirus aviar fue positivo mediante el protocolo empleado.

DISCUSIÓN

Los oligonucleótidos diseñados con los criterios descritos pueden demostrar ser de utilidad para la detección de rubulavirus porcino en fases agudas de la enfermedad de ojo azul puesto que dieron resultados positivos en las muestras de tejidos de encéfalo de cerdo infectados experimentalmente durante los primeros días de la infección. Debido a que existe un alto número de copias de ácido nucleico viral en dicha fase, es posible que ese factor contribuyera fuertemente al éxito de la hibridación. Sin embargo, las condiciones en las infecciones de campo suelen ser diferentes por lo que es conveniente validar el protocolo con muestras de brotes de campo para determinar su utilidad como prueba diagnóstica. Adicionalmente y dada la capacidad del rubulavirus porcino de persistir y desarrollar estados de latencia, debe considerarse que en los brotes de campo podemos enfrentarnos a las situaciones descritas y tener fallas en la detección del virus. Por tal motivo, debe realizarse la evaluación posterior del protocolo en infecciones persistentes para a su vez determinar posibles sitios de latencia. En caso de no obtener resultados positivos con el protocolo descrito, se tiene proyectado la estandarización de un protocolo de PCR *in situ* utilizando las secuencias de oligonucleótidos como iniciadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Berg et al, 1996. J. Vet. Diagn. Invest. 8, 405-413
- Boehringer-Mannheim, 1996
- Brown, 1998. Vet Pathol. 35, 159-167.
- Linné et al, 1992. Vet. Microbiol. 33, 263-273