

UTILIZACIÓN DE LOS MÉTODOS MOLECULARES PARA EL DIAGNOSTICO DE LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA *

*José Darío Mogollón¹, María Antonia Rincón¹, Sonia Sabogal², Ángela Lora², Sandra de la Rosa². ***

INTRODUCCIÓN

La Peste (fiebre) Porcina Clásica (PPC o FPC) es una enfermedad viral altamente contagiosa que causa importantes pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial. El agente causal del FPC es el virus de la Fiebre Porcina Clásica (VFPC), perteneciente al género Pestivirus, familia Flaviviridae. Este virus afecta cerdos domésticos, silvestres y jabalíes, causándoles un severo Síndrome hemorrágico generalizado como una de las manifestaciones más importantes de la forma aguda de la enfermedad.

El genoma del VFPC está formado por ARN de cadena sencilla, polaridad positiva de aproximadamente 12.3 Kb, el cual contiene un marco de lectura abierto (ORF) que está flanqueado por dos regiones no codificantes (UTR) en los extremos 5' y 3'. Este ORF codifica para una sola poliproteína que después de sufrir una serie de clivajes origina las proteínas virales maduras. Dentro de las estructurales, sobresale la glicoproteína E2 como la más importante, ya que estimula la producción de anticuerpos neutralizantes en el hospedero y es considerada como la más inmunogénica, encontrando hacia su extremo 3' una de las regiones más variables entre los pestivirus. Los genes que codifican para las proteínas no estructurales se localizan en el extremo 3', comprenden dos tercios del genoma e incluyen el gen de la polimerasa NS5B y los otros componentes del genoma.

La enfermedad puede ocurrir en forma aguda o crónica y se caracteriza clínicamente por la presentación de fiebre y hemorragias pudiendo causar alta mortalidad en animales no inmunizados. La situación de la enfermedad en el continente americano muestra países libres de la enfermedad (Estados Unidos, Canadá y Chile), países con áreas libres como México y Brasil y países con problemas endémicos y presentación de la enfermedad en forma esporádica como Colombia o Venezuela.

Esta situación contrasta, con el continente Europeo donde no se vacuna, de tal modo que todos los animales de casos positivos se sacrifican y se imponen medidas sanitarias junto con un seguimiento epidemiológico del brote.

* *Contribución de la Universidad Nacional de Colombia y del Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario ICA -CEISA.*

** *1 Médicos Veterinarios, 2 Bacteriólogas. E mail 1porcicoll@terra.com.co Bogotá -Colombia*

Teniendo en cuenta que los planes de erradicación se deben fundamentar sobre un diagnóstico preciso que elimine la posibilidad de falsos positivos o negativos; se hace imprescindible utilizar técnicas de Biología molecular para el reconocimiento de cerdos afectados con cepas de baja virulencia, las cuales son difíciles de reconocer clínicamente o a través de pruebas convencionales, lo que constituye un foco residual del virus en el campo, siendo un riesgo para los propósitos de erradicación.

En el laboratorio se han desarrollado pruebas de diagnóstico para la detección de anticuerpos específicos contra el virus, para la detección del virus vivo en cultivos celulares, detección del antígeno viral o la detección del ácido nucleico viral. Las pruebas serológicas como la prueba de Elisa o la prueba de NPLA (neutralización) se utilizan generalmente para el seguimiento de granjas expuestas al virus de campo o el virus vacunal. También estas pruebas se utilizan para la certificación de cerdos para el comercio internacional.

Uno de los inconvenientes de las pruebas serológicas es el tiempo que transcurre entre la exposición del cerdo al virus de campo o vacunal y la aparición de la respuesta mediada por anticuerpos. En general los anticuerpos específicos solo se detectan hasta 3 a 4 semanas después de la exposición. En el caso de la infección de campo, entonces del cerdo infectado estaría eliminando virus aún sin seroconvertir, perpetuando así el problema en el campo. La prueba de diagnóstico ideal para FPC es aquella que permite la detección de animales infectados lo más temprano posible.

Por consiguiente, en el caso de nuestros países donde se están desarrollando planes de control y erradicación, surge la necesidad de identificar en forma precisa los aislamientos individuales del virus de la FPC, estableciendo la secuencia exacta de los nucleótidos del genoma viral como una herramienta para entender el éxito o las fallas del diagnóstico en los planes de control y/o erradicación.

En años recientes la amplificación específica de ciertos fragmentos del genoma viral por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha facilitado la tipificación de los virus mediante el análisis de las secuencias virales para complementar la caracterización serológica, permitiendo así el seguimiento de los brotes de campo y el estudio de los patrones de evolución viral.

El propósito de este artículo es describir la importancia de la utilización de los métodos moleculares para el diagnóstico del virus del FPC y el seguimiento epidemiológico de los virus de campo de FPC y mostrar su aplicación tomando como ejemplo la caracterización de cepas de FPC colombianas.

¿Cuál es la aplicación práctica de la clasificación genética de los virus de la FPC?

La clasificación genética de las diferentes cepas del virus de FPC, establece las relaciones entre diferentes aislados (cepas), lo cual es útil para determinar los patrones de trazabilidad (diseminación) del virus y es un reflejo de la diversidad y su extensa distribución genética.

Este método de tipificación genética se ha utilizado para demostrar 1) la diseminación del virus a partir de una fuente original de introducción, 2) la transmisión del agente viral entre el cerdo doméstico y cerdos silvestres, 3) la transmisión viral a través de las fronteras entre países, 4) los brotes de enfermedad asociados a cierto grupo del virus, 5) la persistencia de ciertas variantes en particular y 6) la diferencia entre cepas de campo y virus vacunales.

De otro lado, se reconoce que la técnica de RT-PCR es la herramienta diagnóstica más poderosa para la detección temprana de la infección con el VFPC en animales vivos. En casos experimentales mediante la inoculación de cerdos con cepas de baja, moderada y alta virulencia, la técnica de PCR permitió la detección del virus tres días postinfección. Actualmente existe un método de PCR de tiempo real que permite un diagnóstico en solo 3 horas.

¿ Cómo se efectúa el diagnóstico del virus de la FPC por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa?.

La detección del virus en cerdos vivos se efectúa por una combinación de métodos, uno para detectar el antígeno viral y otros para aislar el virus de las fracciones de la sangre. En los cerdos vivos se colecta sangre con anticoagulante y sin anticoagulante para la obtención de leucocitos, plasma y suero. La detección del virus se hace fundamentalmente en tejidos como bazo, ganglio linfático, ileón, riñón y amígdala por medio de la Inmunofluorescencia indirecta o inmunoperoxidasa en secciones congeladas (criostato) de estos órganos o por medio de Elisa de captura usando sangre con anticoagulante.

El aislamiento viral en cultivos celulares se considera la prueba de “estándar de oro” pero puede tomar entre 24 a 72 horas o hasta 1 semana, dependiendo de la concentración de virus en la muestra. De otro lado como se mencionó, la aparición de anticuerpos en los animales no ocurre sino hasta 3-4 semanas después de la infección, debido a la acción Inmunosupresora del virus.

En general se considera que la detección del virus en muestras clínicas es más eficiente con RT-PCR anidada. Esta metodología es más sensible que el aislamiento viral. En un estudio comparativo de diversas técnicas de diagnóstico, se demostró que RT-PCR (anidada) detecta un cerdo infectado 2.8 días mas temprano que el aislamiento viral cuando se utiliza sangre completa.

Para el diagnóstico o detección del genoma viral, se requiere primero la obtención del ARN viral o material genético del virus del FPC que esta presente en leucocitos sanguíneos o en los tejidos corporales de los animales afectados (bazo, ganglio linfáticos etc). Se extrae el ARN y se purifica de los especímenes de campo, por métodos convencionales ya establecidos y conocidos. El ARN viral presente en los tejidos se amplifica ciento de veces por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), pero primero se necesita obtener una copia de ADN de este ARN, puesto que el PCR trabaja solo con ADN.

Para tal efecto, luego mediante una transcripción reversa (con una enzima transcriptasa reversa) se obtiene una cDNA, la cual sirve de base para la amplificación por PCR y así confirmar la presencia de un fragmento del genoma viral en los tejidos afectados.

Luego del DNA del fragmento obtenido se puede utilizar la secuenciación mediante procedimientos bioquímicos usando un secuenciador automático para determinar así la secuencias nucleotídicas de una cepa viral en particular (figura 1).

La tipificación y clasificación de los pestivirus basada en anticuerpos o análisis de perfiles restricción es menos discriminatorio que el análisis de las secuencias de nucleótidos, ya que esta última no solo proporciona una herramienta poderosa para diferenciar y agrupar los pestivirus, sino que también es usada como una metodología útil para estudiar y analizar la epidemiología durante los brotes de FPC.

Las tres regiones del genoma del virus de la FPC que más se han utilizado para estudios de secuenciación y estudios filogenéticos son:

- 1- La mitad (190 nt) de la proteína E₂ hacia la región N terminal, la cual es una zona muy variable entre las diferentes proteínas de los pestivirus.
- 2- Un fragmento de 150 nucleótidos de la región 5' UTR
- 3- Un fragmento de 409 nucleótidos del gene NS5B

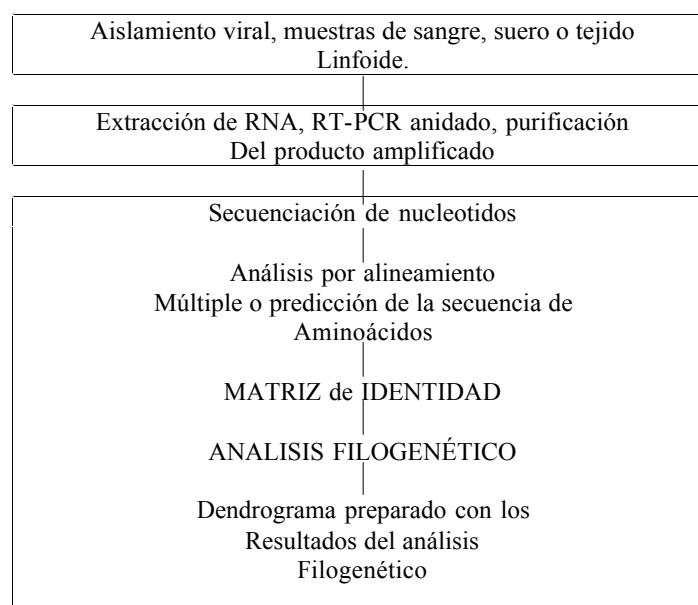


Figura 1. el análisis de las secuencias de nucleótidos de aislamientos del virus de FPV, se pueden dividir en 3 etapas o fases. La primera es la colección de muestras clínicas. La segunda es la detección del RNA genómico por un método molecular y la tercera es el análisis de las secuencias del fragmento del genoma viral.

Para diagnóstico también se ha utilizado la detección de fragmentos conservados de las regiones anteriormente descritas.

¿ Cómo se lleva a cabo el uso de la interpretación de las secuencias del virus de PPC?

Una vez se obtiene un fragmento del gen E₂ de 271 Pb por medio de RT-PCR anidada, se procede a la purificación y secuenciación automatizada de los productos de PCR.

La información más útil se obtiene generalmente mediante comparaciones de las secuencias que se están examinando (cepas de campo en particular), con una base de datos que tenga secuencias de virus vacunales, cepas de referencia internacional como la cepa China, cepa Alfort, Brescia etc. Que están con las bases de datos del genBank con otras secuencias de cepas de campo. Este análisis se realiza mediante alineación de las secuencias (alineamiento múltiple) para buscar similitud entre ellas. El alineamiento (matriz de identidad) proporciona un porcentaje de similitud como resultado de las comparaciones entre dos o más cepas de FPC. El alineamiento de las secuencias también produce información visual sobre secuencias consenso (idénticas), pues al ordenar el set de secuencias se puede observar y comparar base por base la comparación de la secuencia de nucleótidos en su posición individual dentro de un gene de interés. Este examen mediante un programa de computador (Blast análisis) identifica mediante puntos las secuencias consenso (que son iguales o idénticas), mientras que las bases que son diferentes se representan por una letra símbolo para nucleótidos. Una simple revisión visual del alineamiento múltiple entonces nos permite ver la relación general que existe entre varias cepas y los cambios específicos que han ocurrido por sustituciones en algunos sitios.

El alineamiento de secuencias es muy útil para el monitoreo de cepas de FPC en una población en un tiempo determinado. Esto puede ayudar a diferenciar múltiples cepas y puede facilitar la detección del origen de un brote debido a la aparición de una nueva cepa viral. Así se puede conocer la relación epidemiológica que existe entre cepas que circulan dentro y entre granjas de una zona geográfica (figura 1).

Para los estudios filogenéticos y la construcción de dendrogramas se han utilizado 190 nucleótidos del gen E₂ y 150 nucleótidos de la región 5' UTR. La nomenclatura más aceptada para describir los diversos grupos y subgrupos virales del virus FPC en el mundo se basa en el método de Lowings et al (1996) y Patón et al (2000).

Así, los estudios filogenéticos del virus de la FPC han dividido los virus en tres grupos principales tomando como base la comparación de secuencia del genoma viral. El grupo 1 incluye una colección de virus con una gran variación cuya clasificación no es muy precisa. Se encuentran en este grupo virus europeos aislados entre 1920 y 1970 y todos los aislados de América. Tiene 3 subgrupos designados como 1.1, 1.2 y 1.3. En el subgrupo 1.1 se encuentran las cepas de referencia como la cepa Alfort y otros utilizados como vacunas. Además se incluyen las cepas aisladas en Norteamérica entre los años 40 y 50. En este subgrupo se incluyen también cepas de México aislados en los 90 (1991 a 1997). En

contraste las cepas circulantes en Cuba pertenecen al grupo 1.2 y las de Honduras y Guatemala al 1.3.

De otro lado, la mayoría de los aislamientos que se han hecho en Europa entre los años 80-90 se ubican en el grupo 2. Se reconocen los subgrupos 2.1, 2.2 y 2.3. Por ejemplo los virus responsables de la gran epizootia del año 1997 en Holanda, Alemania, Italia etc. Se ubican en el grupo 2.1.

Los estudios filogenéticos sugieren que la distribución del virus es mundial, no obstante la diseminación de las diferentes variantes de FPC dependen de la zona geográfica. En algunas zonas por ejemplo ha ocurrido un cambio marcado de la variante (grupo) de FPC que predominaba. Esta observación se pudo hacer en Europa donde ocurrió un cambio del grupo 1 antes de los años 70 al grupo 2 a partir de los 80. En contraste, en las Américas particularmente en Centroamérica y Suramérica el grupo 1 parece que ha persistido por muchos años. Esto también difiere ampliamente con Asia donde hay una gran diversidad genética entre los aislados de PPC, allí fuera de los grupos 1 y 2 se han encontrado grupos como el 3.2. 3.3 y 3.4.

En general se considera que el virus de FPC es relativamente muy estable, lo cual es muy llamativo siendo un virus ARN y más aún si se compara con otros virus ARN de los cerdos como el virus del PRRS, el cual presenta una alta variabilidad genética. Se ha calculado que existe una frecuencia de mutación del 2.7×10^{-3} por año para el gene E_2 de la FPC.

¿ Que estudios se han realizado en Colombia sobre la FPC desde el punto de vista de diagnóstico epidemiológico molecular?

En un estudio se logró amplificar por RT-PCR un fragmento de 500 pb del gene p120 (N52-3) a partir de la amígdala, bazo, riñón e hígado de animales inoculados experimentalmente con una cepa de campo de FPC (cepa Santander). Igualmente se llevó a cabo el diagnóstico de FPC en tejidos en descomposición 48 horas después de la muerte de animales que habían sido experimentalmente infectados.

En otra investigación reciente (De la Rosa et al 2004) se estudió por RT-PCR anidados la presencia de infecciones virales persistentes y congénitas causados por el virus de la FPC en muestras de tejidos de casos positivos de campo, tonsilas de cerdas de descarte. Se amplifica un fragmento de 270 pb del gen E_2 . Se logró el diagnóstico en 14 casos de 20 casos de campo estudiados en 8 muestras de tonsilas de cerdas gestantes y dos tonsilas de cerdos de descarte. Se concluyó que se demostró la presencia de infecciones virales persistentes en animales adultos de granjas porcinas del país

También nuestro grupo de trabajo efectuó un significativo estudio de epidemiología molecular, en dicha investigación e examinaron nuestras de campo procedentes de un caso ocurrido en 1998, dos en 1999 y 20 casos del brote presentado en los años 2002 – 2003. Se

incluyó además un aislado de los años 80 (cepa Santander), el cual es utilizado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) para la realización de la prueba de potencia en la evaluación de los lotes de vacuna comerciales. Se examinó también la cepa vacunal (cepa china) empleada por un laboratorio comercial para la producción de la vacuna viva atenuada. Se amplificó un fragmento de 271 pb del gen E₂ por RT-PCRn y luego se realizó la purificación y secuenciación de los productos.

Los aislados colombianos se clasifican en el grupo 1, subgrupo 1.1 de acuerdo con la clasificación de Lowings (1996). Las diferencias nucleotídicas entre las cepas de los brotes del 2002 y 2003 estuvieron en el rango de 1-6 bases. La mayor diferencia fue de 17 sustituciones entre los aislados col 3223/98 y col 4438/02.

La cepa China utilizada a nivel nacional para la elaboración de vacunas, se ubicó en el grupo 1, subgrupo 1.1 y mostró una homología del 96.44% en comparación con la cepa “Santander” utilizada en las pruebas de potencia vacunales. (figura 2)

Estos análisis permitieron concluir que los casos ocurridos entre los años 2002 y 2003 fueron ocasionados por un mismo virus, el cual se extendió desde el centro del país (Cundinamarca) a otros departamentos vecinos, alcanzando a San Andrés islas en el mar Caribe. La difusión de la enfermedad se atribuyó a la movilización de los animales infectados, el transporte terrestre, aéreo de cerdos y subproductos contaminados y la alimentación de cerdos con residuos de restaurantes que contienen carne porcina contaminada.

La ubicación de los aislados colombianos en el grupo 1 es coincidente con la clasificación filogenético obtenida en el análisis de otros aislados del continente, confirmando el agrupamiento genéticos de las cepas Americanas. Dentro del subgrupo 1.1 se han incluido también aislados de México, Argentina y Brasil

Se debe destacar que durante el brote del año 2003-2004 se aprovechó la oportunidad para comparar los resultados diferentes, pruebas de diagnóstico que se encuentran disponibles en el país (tabla 1) con la Inmunoperoxidasa indirecta utilizando tejidos fijados en formalina con un anticuerpo monoclonal contra E₂ e Histopatología rutinaria con Hematoxilina. Eosina. (Tabla 1).

Tabla 1. RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS DIFERENTES TÉCNICAS UTILIZADAS BROTE 2003-2004 (Resumen de trece casos)

No. De casos	Inmunoperoxidasa		Diag. Histopatológico (cerebro)	RTPCR	IFD	AV
	Gan. Linf.	Bazo				
4	+++	++	FPC	+	+	NR
5	++++	++++	FPC	+	+	NR
6	++	++	FPC	+	+	NR
7	+++	++++	FPC	+	+	NR
8	+	++	FPC	+	-	NR
9	++	+++	FPC	+	-	NR
10	++++	+++	FPC	+	+	+
11	+++	+++	FPC	+	+	NR
12	++	+++	FPC	+	+	NR
13	++++	++	FPC	+	+	NR
14	+++	++	FPC	+	+	+
15	++++	+++	FPC	+	+	NR
16	++++	+	FPC	+	+	+

NR = No realizado AV= Aislamiento viral

Para observar algunas diferencias relevantes en los resultados, se puede mencionar que de 19 casos en los que se realizó el intento de aislamiento viral se logró en 14 (73.68%). En el año 2002 se estudiaron 38 casos por PCR y se encontraron 36 casos positivos. Se encontró una alta correlación entre PCR, Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia directa.

La conservación de las muestras desde la toma en el campo hasta la recepción en el laboratorio y la variación de la temperatura en la congelación o los procesos de autólisis, pueden influir notoriamente en los resultados. Para efectos de los proyectos de control y/o erradicación, se requiere el uso rutinario de una combinación de métodos de diagnóstico para lograr una buena vigilancia epidemiológica.

REFERENCIAS

Díaz de Arce, H; J. I.; Garcés, L.; Barreras.; Frias M.T; Sobrino, F. 1999. Molecular Epidemiology of Classical Swine fever in Cuba. *Virus Research* 64: 61-67

De la Rosa, ZR.; Mogollón, J.D.; Rincón, M.A.; Preciado, P.; Cepeda, B.M.; Ruiz, S. 2004. Detección de las infecciones congénitas y persistentes por el virus de la Peste Porcina Clásica. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 51:74-83.

Dewulf, I.; Koenen, F.; Mintiens, K. et al. 2004. Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection. *J. virol. Met.* 119: 137-143.

Lowings, P.; Ibata, G.; Needham, J.; Paton, D. 1966. Classical Swine fever virus diversity and evolution *J. of gen virol.* 77: 1311-1321.

Paton, D.J.; McGoldrick, A.; Greiser – Wilke, I. et al. 2000. Genetic typing of classical Swine fever *vet microbiol* 73-137-157.

Pereda, A.J. I.; Greiser – Wilke, B.; Schmitt, M.A.; Rincón.; J.D.; Mogollón.; Z.Y. Sabogal.; A.M. Lora.; H. Sanguinetti.; M.E. Piconne. 2005. phylogenetic Análisis of Classical Swine fever (CSFV) field Isolates From outbreaks in South and central america *Virus Research* 110: 111-118.

Rodríguez, R. Evaluación retrospectiva de casos con historia de Síndrome Nervioso Porcino mediante histopatología. Tesis postgrado Universidad Nacional de Colombia 2004.

Sabogal, Z.Y.; Rincón, M.A.; Mogollón, J.D.; Clavijo, A. 2004. Epidemiología Molecular de la Peste Porcina Clásica en Colombia *Rev. Med. Vet. Zoot.* 51: 20-32.

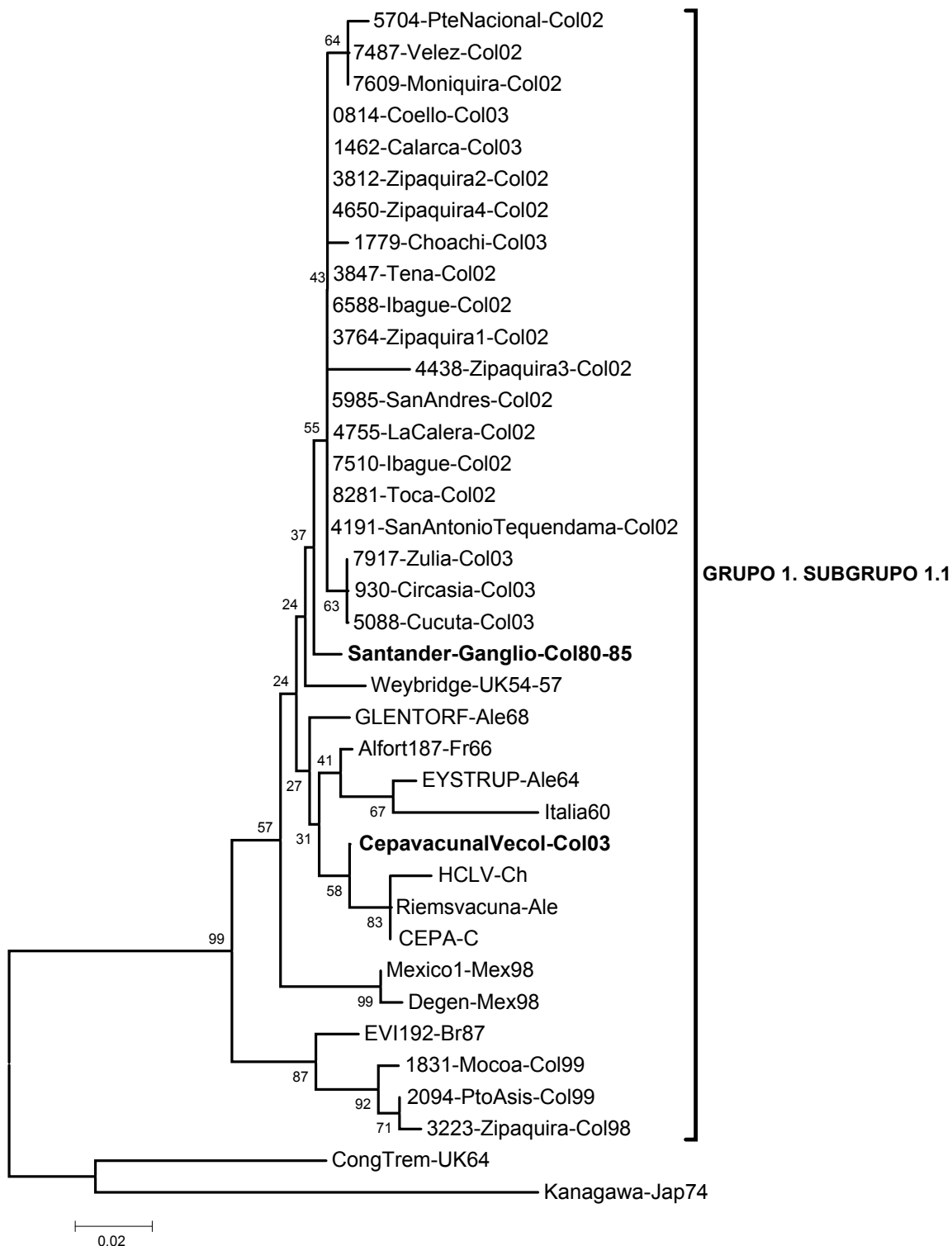


Figura 2. Árbol sin raíz construido por el método de Neighbour – Joining utilizando 190 nucleótidos de la región que codifica para la proteína E2. Incluye 25 aislados colombianos del virus de la Peste Porcina Clásica clasificados en el grupo 1, subgrupo 1.1