

## ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA HIBRIDACIÓN IN SITU PARA LA DETECCIÓN DE CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2).

García-Camacho, L.A. \*, Huerta-Juárez, G.A., Vargas-Cerón, V., Romero-Sánchez, Y., Quintero-Ramírez, V., García-Reyna, P.B.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

### INTRODUCCIÓN

La circovirus porcina está asociada al Síndrome Multisistémico y de adelgazamiento Post-destete (PMWS), el síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (PDNS) y recientemente a falla reproductiva en cerdas. Una herramienta para el diagnóstico de circovirus porcina es la hibridación *in situ* (HIS) la cual presenta la gran ventaja de permitir correlacionar la detección de la presencia de ácidos nucleicos viral con los hallazgos histopatológicos.

### OBJETIVO

Con el fin de proporcionar una opción de diagnóstico de PCV2 accesible que contribuya al control de la enfermedad dentro de las granjas se estandarizó una técnica de HIS.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Para la estandarización de la técnica se emplearon como controles positivos muestras conservadas en formalina y embebidas en parafina, de tejidos linfoides de casos de PMWS con lesiones y cuerpos de inclusión característicos provenientes del estado de Jalisco y de casos del estado de Hidalgo con lesiones de PDNS y probadas por HIS en España y como controles negativos se utilizaron muestras de tejido linfóide procedentes de animales sanos. En ambos controles se utilizaron mezclas de hibridación con la sonda marcada específica para PCV2. Adicionalmente, en cada experimento de HIS se emplearon controles internos de hibridación para cada tejido positivo a PCV2 en los cuales la mezcla de hibridación no contenía la sonda marcada. Para tal efecto se obtuvo una sonda de cADN por PCR empleando un marcaje directo con digoxigenina (DIG) y purificación del producto de la PCR mediante el uso de kits comerciales. Las reacciones de hibridación *in situ* se realizaron en secciones de tejido utilizando laminillas electrocargadas (Probe On plus) y se manejaron en una estación de trabajo siguiendo metodología rutinaria. Para la estandarización de la hibridación *in situ* se utilizaron tres diferentes concentraciones de la sonda de cADN-DIG marcada derivada por PCR con el fin de determinar la concentración óptima para la obtención de una adecuada señal de hibridación. Dichas concentraciones fueron 534 ng, 200 ng y 134 ng en 200 µl de solución de hibridación.

### RESULTADOS

El método de marcaje de la sonda consistió en la incorporación directa de dUTP marcado con DIG durante la amplificación por la PCR y proporcionó una sonda con peso molecular mayor a 500 pares de bases (bp) la cual se visualizó en gel de agarosa.

En los experimentos de HIS descritos, todos los controles negativos utilizados no presentaron ninguna señal de hibridación y los fondos de las preparaciones se apreciaron limpios. Así mismo, todos los controles internos de hibridación que no contenían la sonda y se corrieron paralelamente a los controles positivos de PMWS y PDNS exhibieron fondos limpios los cuales representan ausencia de reacción inespecífica. En los controles positivos, se apreció señal de hibridación positiva en todas las concentraciones utilizadas, siendo la concentración de 200ng/200 µl la óptima para la detección del PCV2. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la concentración óptima y la concentración mínima utilizada.

### DISCUSIÓN

En el presente trabajo se optó por el método de marcaje directo debido a que las sondas así obtenidas pueden utilizarse inmediatamente en protocolos de HIS. Sin embargo, lo anterior es recomendable cuando las sondas son utilizadas inmediatamente después de su producción y por lo tanto la purificación en columnas es recomendable. Las sondas específicas fueron probadas de manera directa y purificadas con resultados similares. Con base a los resultados, se recomienda la dosis mínima empleada para el diagnóstico rutinario de PCV2 con el fin de reducir significativamente los costos de la prueba y la operatividad en el laboratorio y alternativamente utilizar la concentración de 534 ng/ 200 µl para el diagnóstico de circovirus fetal y neonatal en donde las cargas virales suelen ser menores.

### REFERENCIAS

- Choi, C. and Chae, C. 2000. J. Comp. Path. 123, 302-305.
- Rosell, C., *et al.*, 1999. J. Comp. Path. 120, 59-78.
- Rosell, C., *et al.*, 2000. Vet. Rec. 146, 40-43.
- Sanchez, E., *et al.*, 2003. Vet. Microbiol. 95, 15-25.