

## ESTANDARIZACIÓN DE UN PCR SIMPLE Y ANIDADADO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY

Socci EG, Carrera SE, Zapata SLE, Coba AMA\*, Chávez CE, Correa-Girón EP  
CENID-Microbiología Animal, INIFAP  
cobaayala@yahoo.com

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Aujeszky (EA) ocasiona importantes pérdidas económicas a la industria porcina. Es causada por un herpesvirus tipo 1 (HVP-1); en la fase aguda causa abortos y una alta tasa de mortalidad neonatal. Existen vacunas genéticamente modificadas que junto con una técnica de ELISA, permiten diferenciar entre animales vacunados e infectados. Sin embargo, existe la posibilidad de que cerdos que no presentan anticuerpos contra el virus de la EA (VEA), se encuentren latentemente infectados con alguna cepa de campo; y éstos pueden ser una fuente de diseminación del virus, y no son detectados fácilmente con las pruebas de ELISA existentes<sup>1,2,6</sup>. Por esta razón, se requieren técnicas diagnósticas cada vez más sensibles y específicas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones óptimas para llevar a cabo un PCR simple (PCR) y anidado (PCRn), que permita detectar al VEA en diferentes tejidos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de bazo, cerebro, nódulo linfático, músculo, pulmón, riñón e hígado de un conejo inoculado experimentalmente, por vía subcutánea (SC) con 1 ml de virus cepa Shope, con título de  $10^{5.8}$  DICC<sub>50</sub>/0.025 ml. Los tejidos fueron colectados a las 48 hrs postinoculación (PI). Se recolectaron, también, once diferentes tejidos (sangre, bazo, cerebro, hígado, médula espinal, nódulo linfático, piel, pulmón, riñón, tonsila y ganglio trigémino) de un cerdo inoculado con 2 ml del mismo virus, y sacrificado a los 4 días PI. Por otra parte, se recolectó el mismo tipo de tejidos de un cerdo libre de la enfermedad y de un conejo sin inocular. Como control positivo se utilizó cultivo de VEA. La extracción de ADN a partir de tejidos y de cultivo se llevó a cabo mediante un kit comercial de la marca roche (High Pure PCR template). Para la amplificación del ADN se utilizaron dos pares de iniciadores, en el PCR simple uno que flanquea 334 pb del gen de la glicoproteína B (gII) del VEA y en el PCRn otro que amplifica un fragmento de 195 pb dentro del primero<sup>3</sup>. La sensibilidad analítica del ensayo se determinó con diluciones decimales del ADN del VEA sometidas a PCR simple y anidado. Adicionalmente se corroboró la especificidad de la

prueba mediante un ensayo con ADN de herpesvirus bovino, rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el PCR simple se logró obtener el producto de amplificación esperado de 334 pb, a partir de todas las muestras del conejo inoculado; y de bazo, nódulo linfático y pulmón del cerdo inoculado. Todas las muestras del conejo y cerdo no inoculados resultaron negativas. Con el PCRn en todas las muestras del conejo y del cerdo inoculado, se obtuvo el producto de amplificación esperado de 195 pb y no así en las muestras de los animales no inoculados. El ensayo de sensibilidad mostró que el PCR simple fue capaz de amplificar hasta 0.65 pg de ADN, mientras que el PCRn hasta 0.65 fg. También se pudo corroborar la especificidad del PCR al no observar ningún amplificado a partir del ADN del herpesvirus bovino.

Los resultados obtenidos en ambas pruebas corroboran lo mencionado en la literatura<sup>3,4,5,6</sup>, que ambos pares de iniciadores fueron capaces de detectar al VEA, pero con algunas modificaciones en las condiciones de amplificación. El PCRn resultó mucho más sensible que el PCR simple, como ya se ha descrito<sup>3,6</sup>. Sin embargo con el inconveniente de que puede haber resultados falsos positivos. Por lo que la siguiente etapa de este trabajo consistirá en validar estas técnicas mediante su comparación con el aislamiento viral, que es la prueba de referencia para el diagnóstico de esta enfermedad<sup>6</sup>.

### CONCLUSIÓN

Se cuenta con una metodología molecular que podrá ser de gran utilidad para complementar el diagnóstico de la enfermedad.

### Referencias

1. Maes *et al.*, 1997. *Vet Microbiol* 55:13-27.
2. Wenjun *et al.*, 2008. *J Vet Diagn Invest* 20: 440- 447.
3. Yoon HA *et al.*, 2005. *J Microbiol* 43 (5): 430-436.
4. A.Eiras,E.Puentes, B.J. Regueiro. 1992.*Fichero Porci*,No.8,Marzo,47-59.
5. Pérez J.L; Díaz de Arce H. *Brazilian Journal of Microbiology*. (2009) 40: 433-438.
6. OIE 2008.*Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. Vol. 1: 46-55.