

Desarrollo de una RT-PCR cuantitativa en tiempo real para *Rubulavirus porcino* y comparación con el aislamiento viral en cultivo celular

Rivera-Benitez JF^{1*}, García-Contreras AC², Reyes-Leyva J³, Hernández J⁴, Sánchez-Betancourt JI¹, Ramírez-Mendoza H¹.
¹FMVZ, UNAM. ²UAM-X. ³CIBIOR, IMSS. ⁴CIAD, AC. *Email: expide@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del ojo azul (EOA) en cerdos es un padecimiento endémico en México. El agente etiológico es el *Rubulavirus porcino* (RVP).¹ Se han identificado tres grupos virales de acuerdo al gen HN, estos grupos además están relacionados a manifestaciones clínicas particulares.² El diagnóstico de la EOA se ha realizado tradicionalmente mediante pruebas serológicas.³ El aislamiento viral es poco utilizado debido al tiempo requerido para su realización. La detección del genoma viral se ha realizado mediante RT-PCR anidada, únicamente se ha probado la cepa prototipo LPMV para su establecimiento.⁴ Se desconoce si esta metodología de diagnóstico es capaz de detectar las diferentes cepas caracterizadas del RVP. El objetivo de este estudio fue desarrollar y evaluar una RT-PCR cuantitativa en tiempo real específica para las diferentes cepas del RVP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la validación de la prueba de RT-PCR en tiempo real se emplearon nueve cepas del *Rubulavirus porcino* obtenidas del año 1980 al 2003 (PPMV, LPMV, PAC1-6, 9). El título de los lotes virales fue determinado en cultivo celular utilizando las diluciones en log₁₀ elaboradas por cuadruplicado, se evaluó el efecto citopático, hemaglutinación e inmunofluorescencia indirecta. En todas las observaciones se empleó el método de Reed & Muench para calcular el título en dosis infectantes en cultivo celular 50% (DICC₅₀). Se realizó la extracción del ARN de los sobrenadantes de cultivos celulares con un sistema comercial de columnas de sílica. Se diseñaron iniciadores y una sonda de hidrólisis tipo TaqMan[®] con el programa libre Primer-Blast del NCBI. Se empleó una región previamente amplificada y secuenciada del gen N del RVP. La reacción de amplificación se realizó en un solo paso empleando un paquete comercial. Para la curva estándar se empleó un ARN transcrito *in vitro* previamente sintetizado y un sobrenadante de cultivo infectado titulado.

RESULTADOS

El límite de detección con base en la curva estándar empleando el ARN transcrito *in vitro*, fue de 10¹⁰ a 10² copias de ARN/ µl, la pendiente fue -3.13 y el coeficiente de correlación (R²) de 0.99 (Fig). Todos los ensayos realizados para la construcción de la curva estándar fueron por cuadruplicado. La curva estándar realizada con diluciones del ARN viral, mostró un límite de detección de 10⁵ a 10⁻² DICC₅₀, la pendiente obtenida fue de -3.88 y una R² de 0.99 (Fig). La equivalencia en número de copias de ARN con base en la curva estándar generada con el ARN sintético fue de 5.37 × 10¹¹ a 2.01 × 10⁰³ copias de ARN/ml. Cada una de las cepas de *Rubulavirus porcino* fue titulada mediante hemaglutinación, efecto citopático e inmunofluorescencia indirecta en cultivo celular y cuantificada mediante la RT-PCR en tiempo real. En las cepas PPMV, PAC-2, PAC-3 y PAC-9 no se observó producción de sobrenadantes con capacidad hemaglutinante. Sin embargo, el efecto citopático

y la presencia del antígeno evidenciado por inmunofluorescencia indirecta, hicieron posible su titulación.

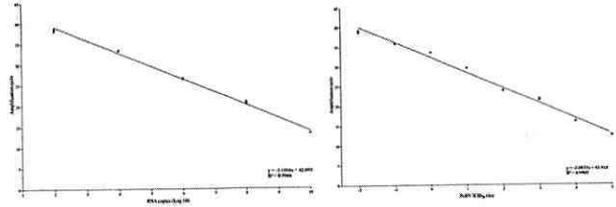


Figura. Curva estándar empleando diluciones decuples del ARN transcrito *in vitro* (izquierda) y ARN viral del RVP (derecha)

Cepa	Titulación HA (DICC ₅₀ /ml)	Titulación ECP (DICC ₅₀ /ml)	Titulación IF (DICC ₅₀ /ml)	Cuantificación (copias ARN/ml)
PPMV	Negativo	5.37 × 10 ⁷	6.16 × 10 ⁵	1.50 × 10 ¹⁰
LPMV	6.30 × 10 ²	6.30 × 10 ³	2.34 × 10 ⁶	3.78 × 10 ¹¹
PAC-1	1.99 × 10 ²	1.14 × 10 ⁷	6.30 × 10 ⁶	2.09 × 10 ¹¹
PAC-2	Negativo	1.14 × 10 ⁶	1.09 × 10 ⁵	1.28 × 10 ¹¹
PAC-3	Negativo	3.38 × 10 ⁷	9.12 × 10 ⁵	4.99 × 10 ¹¹
PAC-4	1.99 × 10 ²	1.99 × 10 ⁴	6.30 × 10 ⁶	3.69 × 10 ¹¹
PAC-5	6.30 × 10 ²	6.30 × 10 ⁴	1.99 × 10 ⁴	3.41 × 10 ¹¹
PAC-6	6.30 × 10 ²	6.30 × 10 ⁴	1.86 × 10 ³	1.32 × 10 ¹¹
PAC-9	Negativo	3.38 × 10 ⁷	1.14 × 10 ⁶	6.65 × 10 ¹¹

Cuadro. Comparación de la RT-PCR cuantitativa y el aislamiento viral en cultivo celular de las diferentes cepas del RVP.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Mediante el establecimiento de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real para el gen N del RVP, se logró detectar a la totalidad de las cepas caracterizadas en los últimos 30 años.^{1,2,5,6} Tradicionalmente en México, se emplea el cultivo celular para evidenciar la presencia viral, la presencia de efecto citopático o de hemaglutinación confirman el resultado positivo. Sin embargo, dependiendo de la cepa se presentará efecto o producción de partículas virales hemaglutinantes, situación que hace menos eficaz a este procedimiento. Mediante el empleo de la RT-PCR cuantitativa y la IF se puede confirmar la presencia de cultivos infectados. La implementación y actualización de las técnicas de diagnóstico del RVP contribuirán al desarrollo de programas de control y erradicación de la EOA y así evitar su posible diseminación a otras regiones de producción porcina nacional e internacional.

REFERENCIAS

- Stephano et al., 1988: Vet Rec, 122, 6-10.
- Sánchez-Betancourt et al., 2008: Res Vet Sci, 85, 359-67.
- Morilla et al., 2002: Trends in emerging viral infections of swine. pp. 59-64. Iowa State University Press, USA.
- Cuevas et al., 2009: Vet Immunol Immunopathol, 127, 148-52.
- Moreno-López et al., 1986: Arch Virol, 91, 221-231.
- Reyes-Leyva et al., 2002: Mensaje Bioquímico, pp. 99-127. Academic Press, UNAM, México.

XLVII Congreso Nacional AMVEEC 2012

Comentarios:

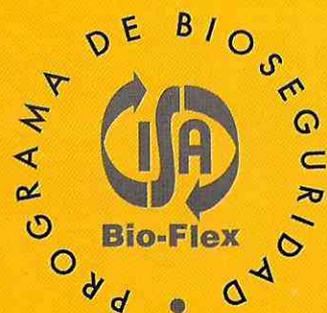


Stalosan® F

Porque el secado no es suficiente



Insumos
NUBIOT[®]
nutrición y biotecnología en la producción pecuaria



El único desinfectante en polvo que controla efectivamente bacterias, hongos, virus, parásitos, humedad y amoníaco.

