

COMPARACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA TRANSCRIPTASA REVERSA, CON EL AISLAMIENTO VIRAL COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA EL VIRUS DE LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA

*Reveles, S.¹, Sánchez, I.¹, Quintero, V.², Carreón, R.¹

¹DMZC-FMVZ-UNAM, México, CDMX. México. ²Asesor privado.

Palabras clave: *Virus de la diarrea epidémica porcina, RT-PCR, aislamiento viral.*

[*mvsaulrevelas@hotmail.com](mailto:mvsaulrevelas@hotmail.com)

Introducción.

La porcicultura hoy en día se ve afectada por enfermedades virales, las cuales son causa de grandes pérdidas económicas que afectan a los productores, en los últimos años ha tomado gran importancia la enfermedad causada por el virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PEDv, por sus siglas en inglés)^(1,5), por lo cual se vuelve importante realizar un diagnóstico diferencial certero para tomar las medidas necesarias. Para esto existen técnicas como inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, microscopía electrónica, inmunoensayo ligado a enzimas, reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) y aislamiento viral (AV)^(1,5). En el presente trabajo se hizo un análisis comparativo entre los métodos diagnósticos de la técnica de RT-PCR con el AV para el diagnóstico de PEDv.

Materiales y Métodos

Muestras. Se utilizaron 136 muestras remitidas al DMZC de intestino delgado de lechones que presentaban cuadro clínico sugestivo a PEDv, estas se analizaron a la par mediante la prueba de RT-PCR punto final y AV. Cada una por separado se maceraron con nitrógeno líquido, se homogenizaron con 10 ml de medio esencial mínimo enriquecido con dubelcos (D-MEM), para después clarificarlo, y esterilizarlo por filtración con membrana de nitrocelulosa de 0.22µm, se almaceno a -20°C hasta su uso⁽⁵⁾.

RT-PCR. Se realizó la purificación del RNA por el método de Trizol (Invitrogen, USA)^(2,3), después se realizó la RT-PCR con el kit comercial Onestep (Quiagen), dirigida hacia el gen M de PEDv, el producto obtenido fue sometido a electroforesis en agarosa al 2%, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un fotodocumentador con luz ultra violeta, con el fin de apreciar la amplificación del fragmento deseado^(2,3).

AV. Se utilizaron células de riñón de mono verde africano (VERO) pasaje 143, sembradas en botellas de 25cm² que se prepararon 24 horas antes de la inoculación. Se realizaron tres lavados con solución buferada de fosfatos (PBS), se agregó 1ml de inóculo y se dejó incubar durante una hora a 37°C, se lavó con PBS y se le coloco medio de mantenimiento D-MEM A las 24 horas se revisó que no existiera contaminación y la lectura se realizó a los cinco días post-inoculación. Para determinar si la muestra era positiva, se tomaron en cuenta cambios morfológicos en el monoestrato celular en base al control de células^(4,5). Con el propósito de obtener la sensibilidad y la especificidad del AV con respecto a la prueba RT-PCR, se realizó una tabla de 2x2⁽⁶⁾.

Resultados y Discusión.

De las 136 muestras de lechones que presentaban signos clínicos sugerentes a PEDv, se obtuvo que con la prueba de RT-PCR hubo un total de 98 muestras positivas lo que

indica un 72.1%, mientras que un 27.9% fueron negativas, sin embargo para el AV se logró apreciar efecto citopático en 41 muestras, lo que representa un 30.1%, este efecto corresponde a lo que diferentes autores han encontrado en muestras positivas a PEDv^(4,5), el 69.9% fueron negativas (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia y porcentaje de muestras positivas y negativas para ambas pruebas diagnósticas.

Técnica / Resultado	RT-PCR		Aislamiento viral	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	38	27.9	95	69.9
Positivo	98	72.1	41	30.1
Total	136	100	136	100

Al comparar ambos métodos, se obtuvo que 36 de las 41 muestras positivas para AV, fueron positivas para RT-PCR. Por otra parte de las 98 muestras positivas para la RT-PCR 62 de estas resultaron negativas para AV, mientras que 33 muestras fueron negativas para AV de las 38 negativas para RT-PCR. Los resultados obtenidos de sensibilidad y especificidad fueron:

		RT-PCR		Total
		+	-	
Aislamiento viral	+	36	5	41
	-	62	33	95
	Total	98	38	136

De acuerdo con lo anterior, la prueba de AV tuvo una sensibilidad de 36.7% y una especificidad de 97%, esto debido a que el PEDv dificilmente replica en los cultivos celulares y se requieren métodos alternos para su detección^(4,5), como lo demostró la RT-PCR en este estudio, debido a la alta sensibilidad y especificidad que se reporta de esta técnica^(1,2), además de que su realización requiere mucho menor tiempo y se pueden analizar más muestras al mismo tiempo, comparada con el AV^(1,3).

Conclusiones.

Este estudio confirma que el método de RT-PCR fue la prueba de elección para confirmar el diagnóstico de PEDv, en comparación con el AV.

Referencias bibliográficas

- Jung K. y Saif L.J. (2015) Vet. Journal 204: 134–143.
- Jing-Hui F. *et al.* (2012) Virus Genes 45:113–117.
- Kim S.Y. *et al.* (2001) J Vet. Diagn Invest 13: 516.
- Shibata *et al.* (2000) Vet. Microbiology 72: 173–182.
- Oka T. *et al.* (2014) Vet. Microbiology 173: 258–269.
- Sánchez M.D.M. *et al.* (2010) Vet. Méx., 41 (1).