

Desarrollo de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa anidada para el diagnóstico de la gastroenteritis transmisible del cerdo

E. Rodríguez⁽¹⁾, A. Betancourt⁽²⁾, D. Relova⁽¹⁾, C. Lee⁽³⁾, D. Yoo⁽³⁾
& M. Barrera⁽¹⁾

(1) Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba

(2) Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José de las Lajas, La Habana, Cuba

(3) Pathobiology Lab. University of Guelph, Ontario, Canada

Autores de contacto: abmartell@yahoo.com, edisleidy@gmail.com

Resumen

El objetivo de este estudio fue desarrollar una reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada) para la detección rápida del virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo. Los cebadores fueron diseñados a partir de regiones altamente conservadas de varias secuencias de este virus incluidas en el análisis. Con los cebadores externos se obtuvo la amplificación de un fragmento de la talla esperada de 441 pb en todas las muestras evaluadas mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), pero de muy baja intensidad. En la segunda amplificación (PCR anidada), con los cebadores internos, se obtuvo la amplificación de un fragmento de la talla esperada de 168 pb, con una buena concentración. El rendimiento de la prueba a partir de virus aislado en cultivo de tejidos y en muestras clínicas fue calificado como bueno para el diagnóstico virológico de la gastroenteritis transmisible del cerdo.

Palabras clave

Gastroenteritis transmisible del cerdo – Reacción en cadena de la polimerasa – Reacción en cadena de la polimerasa anidada – Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

Introducción

Debido a la naturaleza altamente contagiosa de la gastroenteritis transmisible (GET) del cerdo, es imprescindible la disponibilidad de medios diagnósticos rápidos y específicos que permitan obtener un resultado en poco tiempo, para tomar las medidas necesarias e impedir la rápida diseminación de la enfermedad.

Varios métodos se han utilizado para el diagnóstico de esta enfermedad, como el aislamiento viral en cultivo de tejidos (25), el análisis inmuno-enzimático (ELISA) para la detección de virus en heces (27), las técnicas inmuno-

histoquímicas (inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia) sobre cortes de tejidos (31) y los métodos de detección de ácidos nucleicos, que actualmente se desarrollan de forma acelerada, debido a sus ventajas en cuanto a sensibilidad y especificidad, como la hibridación *in situ* (1, 15), la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) (18, 19, 32), la RT-PCR anidada (16) y la PCR en tiempo real (4). También se han descrito métodos serológicos, pero estos tienen la desventaja de la lentitud del diagnóstico, ya que se necesita tiempo para la seroconversión de los animales enfermos. Para el aislamiento viral se requieren muestras frescas y en muchos casos se necesitan varios pases para lograr la identificación, por lo que el diagnóstico consume mucho tiempo y es insuficiente (26).

Teniendo en cuenta los aspectos descritos anteriormente, nos propusimos desarrollar herramientas de diagnóstico que nos permitieran realizar una identificación del virus de la GET (VGET) del cerdo de forma rápida, específica y con buena sensibilidad, y que pudieran emplearse para la detección del virus tanto en muestras de órganos (*post-mortem*) como de animales vivos, lo que puede ser de gran utilidad en la aplicación de medidas relativas al traslado de animales entre unidades, para evitar el riesgo de introducir animales enfermos o portadores en explotaciones libres de la enfermedad.

Material y métodos

Cebadores

Durante el desarrollo de esta técnica se emplearon dos parejas de cebadores anidadas que amplifican un fragmento del gen *N*, el cual codifica la proteína *N* (fosfoproteína) (38) que, unida al genoma viral, forma la nucleocápsida del virus (3, 10, 21, 24). Las secuencias de los cebadores empleados en el primer ciclo de PCR fueron gentilmente donadas por el Dr. Changee Lee, Departamento de Patobiología, Universidad de Guelph, Ontario, Canadá (Cuadro I). Esta pareja fue utilizada en el diagnóstico diferencial del VGET y el virus de la diarrea epidémica del cerdo (VDEP) mediante la técnica de la RT-PCR en brotes de VGET acontecidos en Corea (Lee, 2006; comunicación personal). La segunda pareja (Tabla I) fue diseñada para amplificar un fragmento contenido en el segmento amplificado durante el primer ciclo de PCR.

Los programas empleados en el diseño de los cebadores fueron los siguientes: Gene Runner Version 3.05 (Hastings Software 150 (33) (www.generunner.com), CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment Program (www.ebi.ac.uk/clustalw), Oligo Analyser versión 1.1.2 (22) (www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware), BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Cuadro I
Secuencias de los cebadores diseñados para la detección del VGET.

Cebadores	Secuencias (5'-3')	Posición ^a
*TGENF (Sentido)	CTGGAAGAGAACTGCAGGTA	27624 - 27643
*TGENR (Antisentido)	TTAGTTCGTTACCTCATC	28065 - 28048
TGENFI (Sentido)	GGCGACCAGATAGAAGTCACG	27811 - 27831
TGENRI (Antisentido)	CTTGCTCTGACCTTTCTGCAG	27979 - 27959

* Cebadores donados gentilmente por el Dr. Changee Lee, Universidad de Guelph, Ontario, Canadá, 2006

a) La posición de los nucleótidos se corresponde con la secuencia de la cepa Purdue. Código de Acceso en la base de datos GenBank: NC_002306

El diseño se estableció a partir de regiones altamente conservadas, con un 100% de identidad entre las secuencias del VGET incluidas en el análisis, las cuales se obtuvieron en la base de datos GenBank (AJ271965, NC_002306, AY587884, AY335549, AF104420 y DQ443743). Con la finalidad de incrementar la especificidad de la técnica, se incluyeron secuencias del gen *N* del VDEP (AF237764, AY653206, DQ072726, DQ355221, DQ355223, DQ355224, Z14976), introduciendo en el programa, como condición, que la pareja de cebadores consenso no amplificara ninguna de estas secuencias, ya que el VDEP y el VGET pertenecen al grupo 1 del género coronavirus y presentan una relación genética muy estrecha (3, 11).

Purificación del ARN viral

Se realizó utilizando el reactivo TRI REAGENT™ (SIGMA), según el protocolo descrito para este producto en el boletín técnico MB-205 (1999).

Reacción de transcripción inversa

Se mezclaron 10 µl del ARN purificado y 1 µl del cebador TGENR (10 pmol/µl) y se incubaron durante 10 min a 70°C; luego se colocaron los tubos en hielo rápidamente durante 5 min. A cada reacción se le añadieron 9 µl de una mezcla que contenía 4 µl de tampón RT (5X, Promega), 2 µl de DTT (Promega), 2 µl de dNTPs (40 mM), 0,5 µl de RNAsin (40 U/µl, Promega) y 0,5 µl de M-MLV (Enzima RT) (200 U/µl, Promega). Se incubó la reacción durante 2 h a 42°C y 10 min a 95°C.

Optimización de las pruebas PCR y PCR anidada

Durante la optimización se empleó sobrenadante de cultivos celulares infectados con la cepa Purdue 115. Los volúmenes y concentraciones finales de la PCR que se emplearon como base para la optimización fueron los recomendados por el boletín técnico N° 254 de la PCR Core System de Promega®, donde se establecen las siguientes pautas: tampón de reacción de la ADN polimerasa Taq (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 9.0% y Triton® X-100 al 0,1%), solución de cloruro de magnesio (0,5-3 mM), mezcla de nucleótidos (cada uno a una concentración 0,2 mM), cebadores (0,1-1,0 µM), ADN polimerasa Taq (1,25 U), ADNc (0,05-0,5 µg) y completar con agua hasta un volumen de 50 µl. Como control negativo de las reacciones se sustituyó el ADNc por el mismo volumen de agua libre de nucleasas (Promega).

Las temperaturas de alineamiento, así como las condiciones de amplificación de cada PCR se ajustaron

empleando el termociclador Eppendorf Thermal Cycler Gradient. Primer ciclo de PCR: incubación de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos (45 s a 94°C, 45 s a entre 50°C y 60°C y 1 min a 72°C) y una incubación final de 10 min a 72°C. PCR anidada: incubación de 3 min a 94°C, seguida de 35 ciclos (45 s a 94°C, 45 s a entre 65°C y 68°C y 1 min a 72°C) y una incubación final de 7 min a 72°C.

Las concentraciones óptimas de cebadores y cloruro de magnesio se determinaron a partir de la evaluación de las concentraciones 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 μ M, y 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 y 3,0 mM, respectivamente. En todos los casos se realizó un mínimo de tres réplicas por prueba. Para determinar las condiciones óptimas, se tuvo en cuenta la intensidad de las bandas de amplificación.

Determinación de los parámetros de rendimiento analítico de la prueba

Sensibilidad analítica

Se evaluó a partir de diferentes extracciones de ARN obtenidas de diluciones logarítmicas base 10 de la cepa Purdue 115 ($10^{6,05}$ DICT₅₀/ml) en medio de cultivo, homogenado de intestino y exudado rectal negativos (obtenidos del cerdo utilizado como control negativo). Se evaluó la sensibilidad de la prueba en este tipo de muestras, ya que son las de mayor interés para el diagnóstico de este virus. El principal objetivo era saber si estas contenían algún inhibidor específico de la PCR.

Las extracciones de ARN se obtuvieron a partir de un volumen de 250 μ l de las diluciones 10^{-1} a 10^{-6} , lo que corresponde con los títulos: $10^{4,45}$, $10^{3,45}$, $10^{2,45}$, $10^{1,45}$, $10^{0,45}$ y $10^{0,045}$ DICT₅₀/0,25 ml, y se incluyeron en cada caso sus respectivos controles negativos.

Especificidad analítica

Para la determinación de la especificidad analítica se evaluaron ARN moldes purificados de los virus de la peste porcina clásica (PPC), diarrea viral bovina (DVB), encefalomiocarditis porcina (EMC) y rotavirus porcino, los cuales pudieran encontrarse en muestras de intestinos o heces de cerdos y provocar interferencia con el diagnóstico.

Evaluación de la prueba con muestras clínicas

Se utilizaron seis macerados de intestino delgado, procedentes de animales enfermos en los brotes acontecidos durante la epizootia de Cuba de 2003. En el proceso de selección de las muestras se valoró que fueran positivas por aislamiento viral e inmunoperoxidasa indirecta en cortes de tejido con el anticuerpo monoclonal comercial 1D.B12 (30) (resultados del diagnóstico

realizado durante la epizootia). Cada macerado representa una provincia diferente y se obtuvieron a partir de la mezcla de varios animales de un mismo muestreo. Las muestras se mantuvieron conservadas a -70°C durante cuatro años (2003-2007) (Cuadro II).

Se emplearon 28 exudados rectales obtenidos a partir de la infección experimental en cerdos de un día de edad con la cepa de referencia Purdue 115 y cuatro macerados de intestino procedentes de las necropsias de estos animales, realizadas a las 72 h PI. Cada macerado representó un animal determinado, y se obtuvieron a partir de la mezcla de los tres segmentos del intestino delgado: duodeno, yeyuno e íleon.

La repetibilidad de la prueba se evaluó con 10 muestras de ARN, extraído a partir de sobrenadantes de cultivo de células infectadas con la cepa Purdue 115 y no infectadas, y 10 exudados rectales obtenidos de la infección experimental de cerdos con la cepa de referencia Purdue 115, con resultados positivos y negativos previos, por triplicado cada día durante tres días.

Infección experimental de cerdos con la cepa Purdue 115

Se emplearon cuatro cerdos de un día de edad. De estos animales, tres fueron inoculados por vía oral con 3 ml de la cepa de referencia Purdue 115, con un título infectivo de $10^{4,3}$ DICT₅₀/ml, y el restante se mantuvo como control negativo del experimento, inoculado por la misma vía con 3 ml de medio de cultivo DMEM.

Se tomaron muestras de sangre de todos los animales antes del momento de la inoculación para comprobar, mediante la técnica de neutralización viral, si presentaban anticuerpos maternos contra el VGET, que pudieran interferir con la infección viral. Además, se tomaron muestras de exudados rectales antes y después de la inoculación con una frecuencia de 12 h, hasta las 72 h PI, momento en que se realizó el sacrificio de los mismos por insensibilización con cloroformo y desangrado por punción de la vena yugular.

Cuadro II
Muestras de intestino obtenidas en brotes de campo durante la epizootia del año 2003, utilizadas en la evaluación de la prueba

Provincia	Muestras	Unidad	Fecha	AV	IPI
Pinar del Río	VB 494 – 498	Viet Nam	10-4-03	+	+
Ciudad Habana	VB 481 – 484	Guatao	4-4-03	+	+
Matanzas	VB 38	Multiplicador 1	13-2-03	+	+
Villa Clara	VB 546 – 551	El Negrito	17-4-03	+	+
Cienfuegos	VB 531 – 535	Integral 1	17-4-03	+	+
Holguín	VB 567 – 574	Tomi	8-5-03	+	+

AV: aislamiento viral

IPI: inmunoperoxidasa indirecta en cortes de tejidos

Se les realizó la necropsia a todos los animales tomando muestras de los tres segmentos del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) para su posterior empleo en la evaluación de la técnica desarrollada en este experimento.

Resultados

Optimización de las condiciones de la prueba

En los cebadores del primer ciclo de la PCR, con las temperaturas de 50°C y 55°C se obtuvieron bandas de amplificación de similar intensidad; sin embargo, con la temperatura de 60°C se obtuvieron bandas de reducida intensidad en comparación con el resto (Fig. 1).

En la optimización de la temperatura de alineamiento de la PCR anidada, la temperatura óptima fue 68°C. Se escogió este valor debido a que no se observaron diferencias en la intensidad de las bandas de amplificación obtenidas y, además, porque a 65°C se observó la formación de bandas inespecíficas en presencia de concentraciones elevadas del ADNc molde (Fig. 2).

En la optimización de la concentración de cloruro de magnesio de la reacción, como se muestra en la Figura 3 (primer ciclo de PCR), con las concentraciones de 0.5 y 1.0 mM no se obtuvo ninguna amplificación, y con 1,5 mM se observó un producto de muy baja intensidad, que se incrementó gradualmente al aumentar las concentraciones de MgCl₂ en la reacción, por lo que se tomó 3,0 mM como valor óptimo. Sin embargo, la reacción correspondiente a la PCR anidada dio amplificaciones de

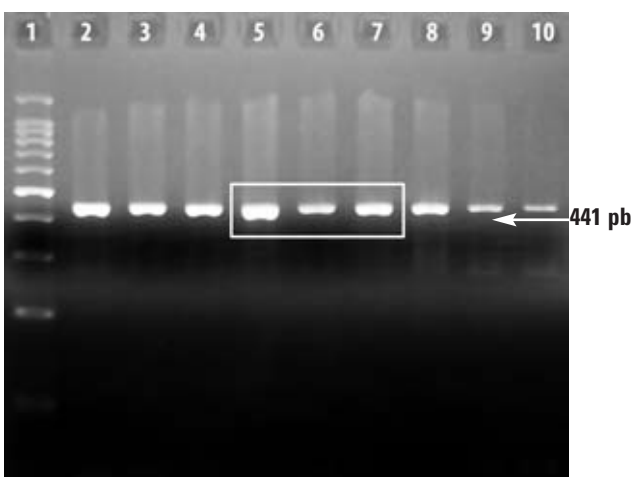


Fig. 1
Temperatura óptima de alineamiento de los cebadores TGENF-TGENR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%

Línea 1: Patrón de peso molecular 1kb plus (Invitrogen). 2-4: 50°C (diluciones 1:10, 1:50 y 1:100); 5-7: 55°C (diluciones 1:10, 1:50 y 1:100); 8-10: 60°C (diluciones 1:10, 1:50 y 1:100)

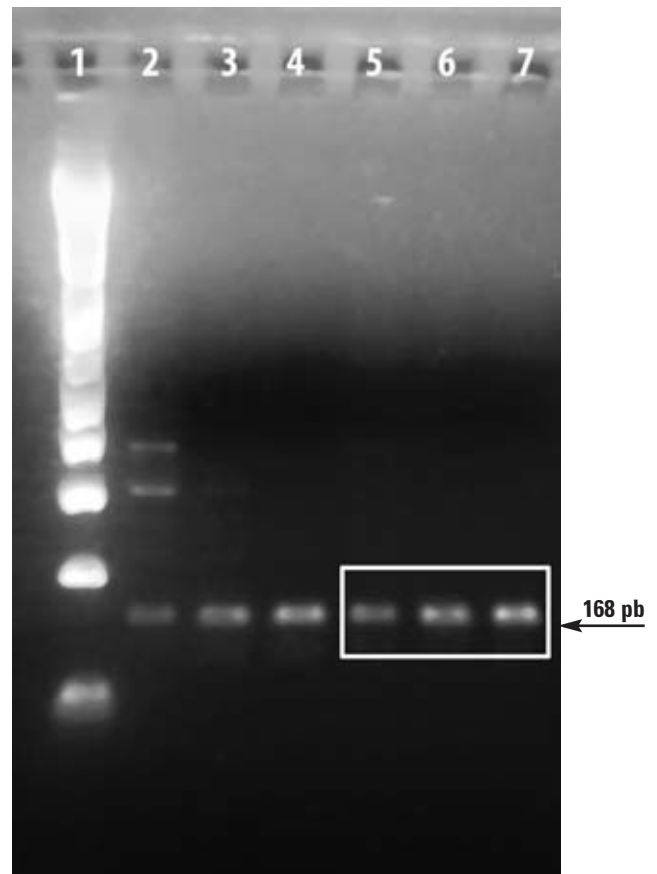


Fig. 2
Temperatura óptima de alineamiento de los cebadores TGENFI-TGENRI

Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Línea 1: Patrón de peso molecular 1kb plus (Invitrogen). 2-4: 65°C (diluciones 1:10, 1:50 y 1:100); 5-7: 68°C (diluciones 1:10, 1:50 y 1:100)

bandas de similar intensidad entre las concentraciones 1,0 mM y 2,0 mM, con la presencia de amplificaciones inespecíficas en la concentración de 2,0 mM a 3,0 mM, donde además se afectó la sensibilidad de la reacción, por lo que 1.5 mM se consideró la concentración óptima.

En cuanto a los cebadores, en la reacción del primer ciclo de PCR la concentración óptima resultó ser 0,6 μM, y en la PCR anidada, 0,8 μM. En ambos casos los valores óptimos se encontraban en el rango de los recomendados por la literatura (Boletín técnico N° 254 de la PCR Core System de Promega®) (7) (Fig. 4).

En la evaluación de la enzima AmpliCEN, como se muestra en la Figura 5, no se evidencian diferencias entre la intensidad del producto obtenido con esta enzima y la del obtenido con la ADN polimerasa Taq (Promega). La sustitución de la enzima importada por esta, de producción nacional, nos permitirá disminuir los costos de la prueba, por lo que resultará más fácil emplearla en el diagnóstico de esta enfermedad.

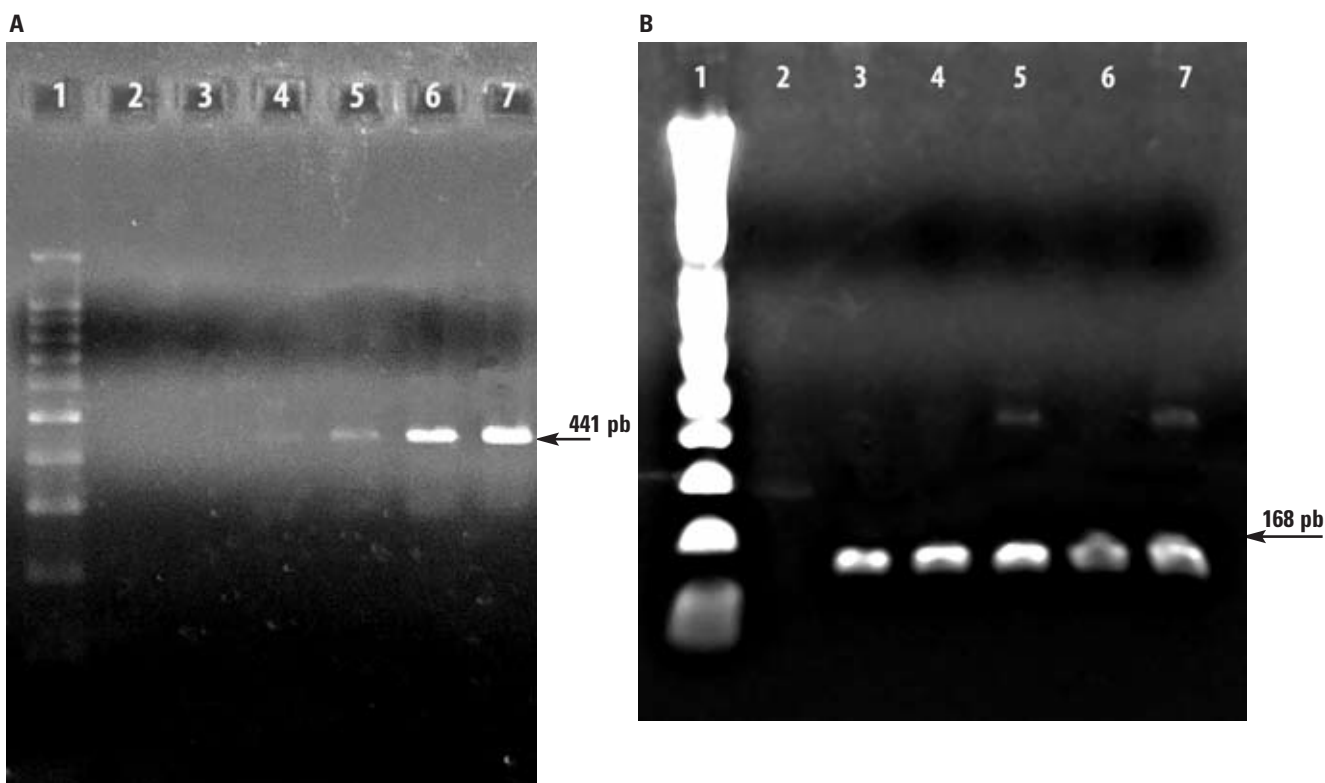


Fig. 3
Concentración óptima de MgCl₂. A: Primer ciclo de PCR. B: PCR anidada
 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Línea 1: Patrón de peso molecular 1kb plus (Invitrogen). 2-7: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 y 3,0 mM

Determinación de los parámetros de rendimiento analítico de la prueba

La sensibilidad analítica no se vio afectada por el tipo de muestra en que se realizaron las diferentes diluciones de virus, y el límite de detección en todos los casos fue de 10^{0,45} DICT₅₀/muestra (Fig. 6).

La especificidad analítica se estableció a partir de los ARN purificados de sobrenadantes de cultivos celulares infectados con diferentes virus que pudieran estar presentes en muestras de origen porcino. En la Figura 7 se muestran los fragmentos de 441 pb y 168 pb, obtenidos a partir de la amplificación de la cepa de referencia del VGET (Purdue 115), con las parejas de cebadores específicos TGENF-TGENR y TGENFI-TGENRI, respectivamente, mientras que no se observaron productos de amplificación en las reacciones correspondientes a los virus de la PPC, la DVB, la EMC y rotavirus porcino buscados con esta prueba.

Evaluación de la prueba con muestras clínicas

Al evaluar la prueba con las muestras de infección natural, se amplificó un fragmento de ADN de la talla esperada en todas las muestras evaluadas, las cuales habían resultado

positivas en el aislamiento viral e inmunoperoxidasa indirecta en cortes criostáticos de intestino. Como se muestra en la Figura 8, durante el primer ciclo de PCR solo se pueden observar las bandas de amplificación positiva en tres de las muestras, mientras que cuando se realiza el segundo ciclo de amplificación todas las muestras resultan positivas, lo cual demuestra la importancia de la PCR anidada para incrementar la sensibilidad de la técnica.

Los resultados obtenidos con las muestras de exudados rectales en diferentes momentos post-inoculación (PI) de los animales infectados experimentalmente con la cepa de referencia Purdue 115 se compararon con los signos clínicos que presentaban los mismos.

Los primeros resultados de amplificación positiva se obtuvieron a partir de las 24 h PI en el cerdo inoculado 3, coincidiendo con la aparición de la diarrea en el mismo animal. A partir de las 36 h PI ya eran positivos todos los animales, a pesar de que el cerdo 1 (C1) aún no presentaba diarrea, lo cual indica que en este momento el virus ya se excretaba en las heces en cantidades suficientes como para ser detectado por la técnica evaluada. A las 60 h PI, en el cerdo 3 (36 h después del inicio de la diarrea) se evidenció la amplificación de una banda positiva con el primer ciclo de PCR, repitiéndose este resultado en el cerdo 2, donde se logró detección del virus

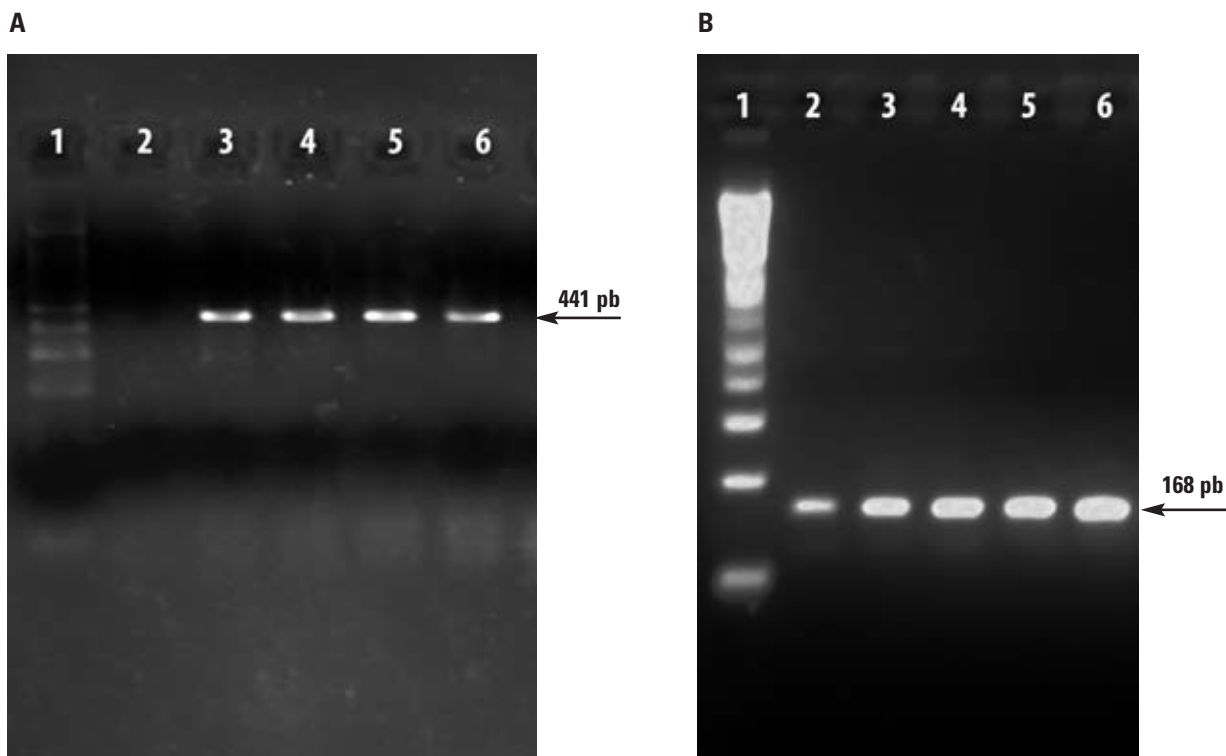


Fig. 4

Concentración óptima de cebadores

A: Primer ciclo de PCR. B: PCR anidada

Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Línea 1: Patrón de peso molecular 1kb plus (Invitrogen). 2-6: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 μ M

con el primer ciclo de PCR 36 h después de que empezara la diarrea.

Las muestras de macerado de intestino obtenidas durante las necropsias de estos animales, realizadas a las 72 h PI justo después de tomar las últimas muestras de exudados rectales, a pesar de resultar todas positivas en la prueba mostraron diferencias en cuanto a los resultados obtenidos durante el primer ciclo de PCR, ya que en la muestra de exudado del cerdo 1 no se obtuvo amplificación. Sin embargo, en el macerado de intestino perteneciente a este animal se pudo detectar el virus desde el primer ciclo de amplificación, lo cual demuestra que a partir de esta muestra se puede obtener una mayor cantidad de partículas víricas, lo cual brinda mayor valor diagnóstico a la misma.

En la comparación de los resultados obtenidos durante la evaluación de la RT-PCR anidada se analizó qué muestras pudieran tener mayor valor desde el punto de vista diagnóstico, teniendo en cuenta la capacidad de la prueba de detectar el virus en una muestra desde el primer ciclo de la PCR o bien mediante el desarrollo completo de la misma, ya que consideramos que es muy importante la calidad de la muestra que se tomará para el diagnóstico, no solo por el hecho de obtener un resultado positivo, sino por la rapidez con que se obtenga este diagnóstico. Cuando la muestra tomada cuenta con una carga de partículas

víricas suficiente como para ser detectada durante el primer ciclo de PCR hace el diagnóstico más eficiente en el tiempo, más sencillo en cuanto a manipulación y más económico debido al ahorro de reactivos que se emplearían durante el desarrollo del segundo ciclo de amplificación (PCR anidada).

La especificidad diagnóstica de la prueba estandarizada se midió en función de los resultados negativos de las muestras de exudados rectales obtenidas de todos los cerdos antes de la inoculación y las tomadas cada 12 h del cerdo no inoculado, así como del homogenado de intestino de este cerdo que resultó también negativo. Hubo concordancia entre los resultados de las tres repeticiones del análisis de todas las muestras, por lo que la repetibilidad de la prueba resultó del 100%.

Discusión

En el desarrollo de la RT-PCR anidada para la detección del VGET se seleccionó el gen *N* como diana de amplificación, debido a su alto nivel de conservación (8, 20). Una característica esencial que incrementa su potencial de uso para el diagnóstico fue la obtenida en un análisis de comparación de secuencias destinado a revisar la taxonomía de la familia *Coronaviridae* y llevado a cabo por

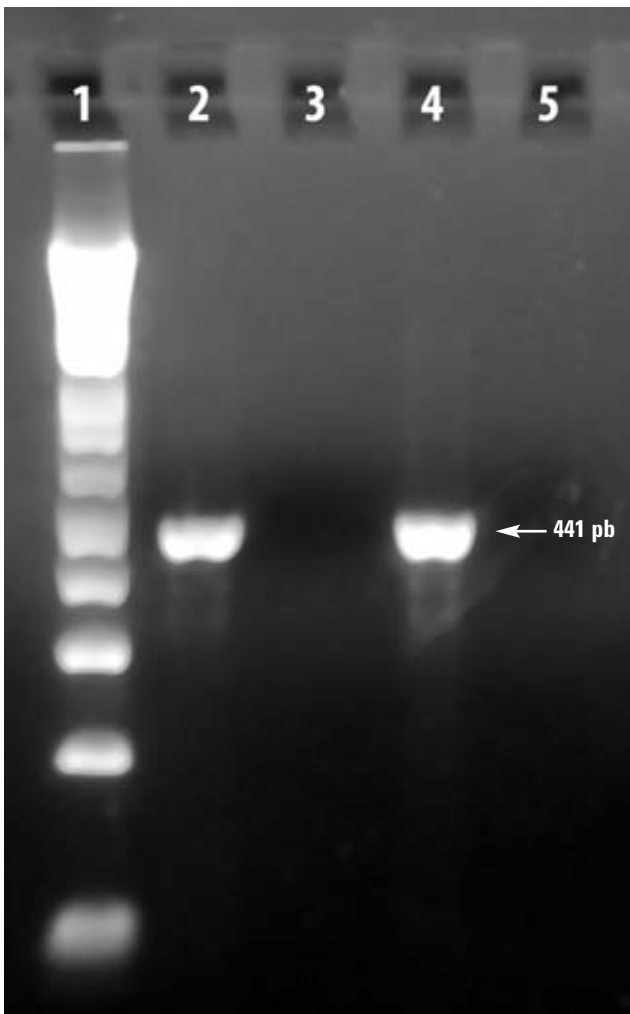


Fig. 5
Evaluación de la enzima AmpliCEN. Cebadores TGENF-TGENR
 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Línea 1: Patrón de peso molecular 1kb plus (Invitrogen). 2-3: ADN Polimerasa Taq (control positivo y negativo); 4-5: AmpliCEN (control positivo y negativo)

González y col. (11), quienes revelaron que los genes *N* y *E* no muestran homología con otras secuencias fuera del género Coronavirus. Además, se ha descrito que la proteína *N* es el antígeno más abundante en células infectadas por coronavirus, debido a que su ARN molde es el más pequeño y abundante durante la transcripción (12, 23). Esto indica que en células infectadas existe más disponibilidad de ARN del gen *N* que de otros genes, lo cual brinda grandes ventajas para su uso como diana en la detección viral, ofreciendo una alta sensibilidad a la técnica diagnóstica (28, 33, 36).

El primer parámetro optimizado fue la temperatura de alineamiento. Los valores evaluados se estimaron según las temperaturas de fusión (T_m , del inglés *melting*) de cada uno de los cebadores, teniendo en cuenta los planteamientos de Bock (2) y Jackson (14), quienes describen que el punto de partida para la optimización de

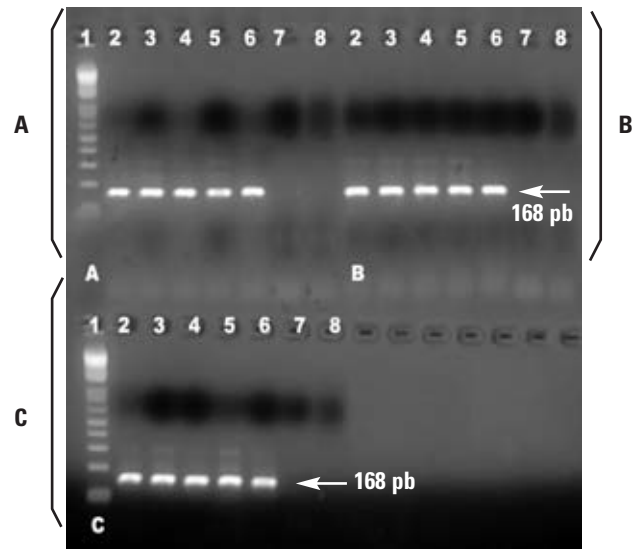


Fig. 6
Sensibilidad analítica de la prueba
Diluciones seriadas de virus en A: Medio DMEM, B: Homogenado de Intestino y C: Exudado rectal
 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Línea 1: Patrón de peso molecular 1kb plus (Invitrogen). 2-7: $10^{4.45}$, $10^{3.45}$, $10^{2.45}$, $10^{1.45}$, $10^{0.45}$ y $10^{0.045}$ DICT₅₀/muestra, 8: control negativo).

la temperatura de alineamiento debe ser 5°C por debajo del valor estimado de la T_m de los cebadores.

La concentración de cloruro de magnesio es un importante factor a optimizar para el logro de un buen rendimiento de la PCR, debido a que los iones Mg^{2+} afectan el alineamiento de los cebadores, la temperatura de fusión, tanto del molde como del producto, la especificidad del producto y la actividad y la fidelidad enzimática. La ADN polimerasa Taq requiere Mg^{2+} libre, por tanto, debe añadirse una concentración suficiente debido a que los dNTP, los cebadores, el ADN molde y agentes quelantes presentes en la muestra pueden secuestrar dicho ion (13).

El hecho que se hayan obtenido resultados similares con el ARN obtenido del virus propagado *in vitro* que con el ARN obtenido a partir de muestras de tejidos y exudados rectales, las cuales son muestras más contaminadas y con mayor actividad de ribonucleasas endógenas, es un resultado muy importante, puesto que nos muestra la capacidad diagnóstica de la prueba (5, 33).

El límite de detección en todos los casos fue de $10^{0.45}$ DICT₅₀/muestra. Estos resultados se corresponden con los altos valores de sensibilidad obtenidos para estos tipos de pruebas moleculares, descritos por Chen y col. (4) con el uso de la PCR en tiempo real, quienes detectaron hasta 10^0 DICT₅₀/ml, y también con los resultados obtenidos por Kim y col. (18, 19) y Song y col. (32) al desarrollar diferentes pruebas de RT-PCR múltiple para el diagnóstico del VGET, el VDEP y rotavirus porcino, con un

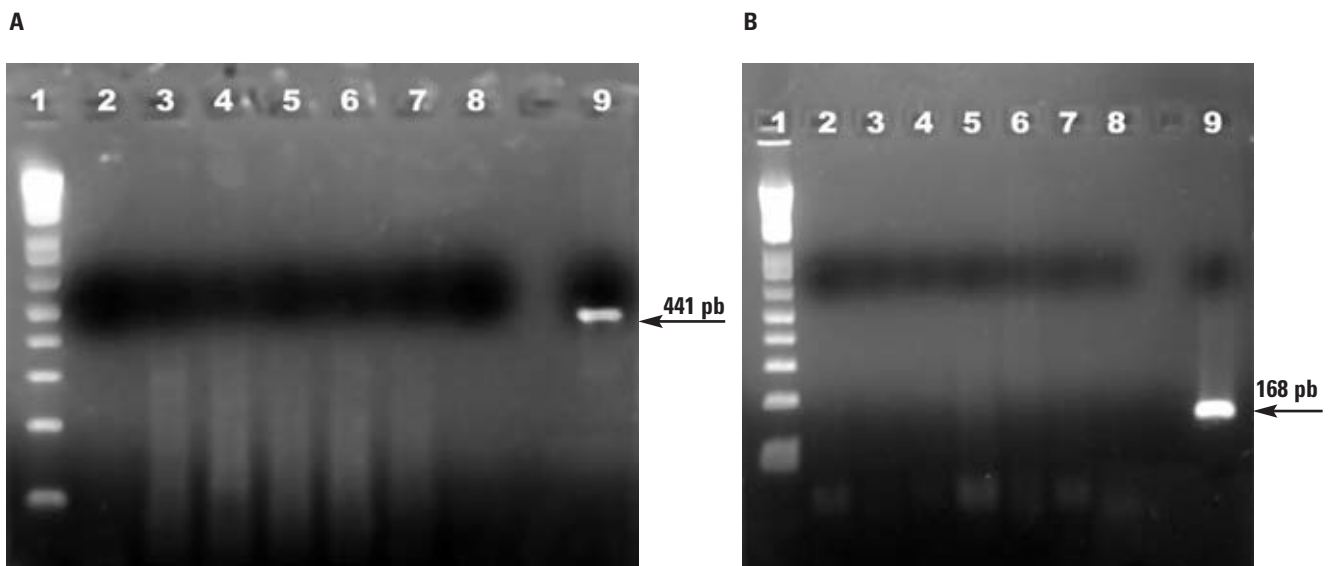


Fig. 7

Especificidad Analítica de la Prueba**A: Cebadores TGENF – TGENR. B: Cebadores TGENFI – TGENRI**

Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Línea 1: Patrón de peso molecular 1kb plus (Invitrogen). 2-3: PPC (Margarita y Alfort); 4-6: BVD (Oregón, NADL, Villa Clara); 7: EMC (744/03); 8: Rotavirus Porcino (Vacuna Intervet) y 9: VGET (Purdue 115)

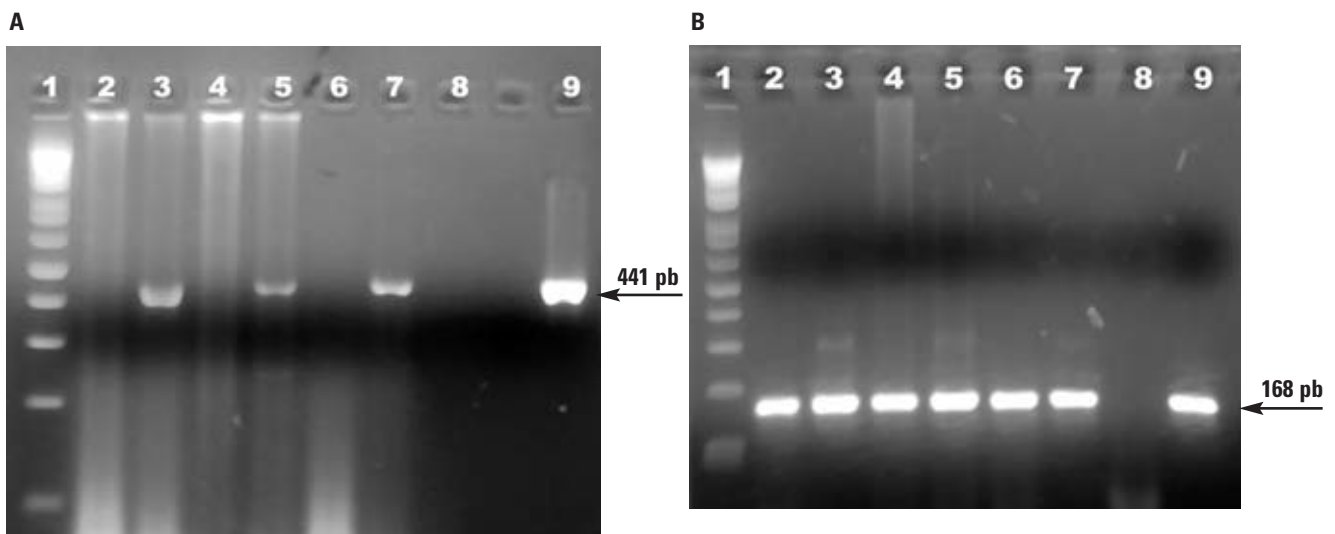


Fig. 8

Muestras clínicas de diferentes provincias**A: Primer ciclo PCR. B: PCR anidada**

Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Línea 1: Patrón de peso molecular 1kb plus (Invitrogen). 2: Villa Clara, 3: Pinar del Río, 4: Holguín, 5: Ciudad Habana, 6: Cienfuegos, 7: Matanzas, 8: Control negativo (H2O), 9: Control Positivo (Purdue 115)

límite de detección de 10^1 DICT₅₀/ml para VGET en todos los casos.

Varias son las PCR descritas para la detección del VGET, pero la mayoría de los autores enfocan sus investigaciones a lograr un diagnóstico diferencial entre el VGET y el coronavirus respiratorio porcino (CVRP), con el empleo del extremo 5' del gen S como diana de amplificación,

donde, en el caso del CVRP, existe una eliminación de 621-681 pb (27, 16). Este gen tiene como desventaja una alta variabilidad en su secuencia (27), lo cual podría comportar la obtención de falsos negativos.

La prueba que se propone en esta investigación está enfocada a la utilización del gen N como diana de amplificación, el cual posee un alto porcentaje de

identidad entre las secuencias del VGET y del CVRP. En este trabajo no se pudo evaluar la especificidad de la técnica frente a cepas del CVRP, ya que es un virus exótico para nuestro país, lo cual se confirmó recientemente con las encuestas serológicas nacionales realizadas durante la epizootia de VGET del 2003. Las muestras de suero fueron evaluadas mediante ELISA Ingezim Corona Diferencial (Ingenasa, S.A), que permite definir si los anticuerpos presentes en los animales evaluados corresponden a una respuesta contra el VGET o contra el CVRP, y como resultado solo se evidenciaron anticuerpos específicos contra el VGET.

Además, se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos por Yoon (37), quien evaluó la detección del CVRP en exudados nasales y rectales por RT-PCR a partir de una infección experimental en cerdos susceptibles y demostró que no se produce excreción del mismo con las heces. Varios autores se refieren a la incapacidad de este virus de multiplicarse en el tracto digestivo, ya que manifiesta un tropismo exclusivo por el tracto respiratorio (6, 16, 17). Por tanto, consideramos que la sensibilidad y especificidad mostradas durante la evaluación de la prueba con el empleo del gen *N* demuestran la gran aplicabilidad práctica ofrecida por la misma como medio de diagnóstico en nuestras condiciones.

Por otra parte, debemos señalar que la prueba fue capaz de detectar el virus a partir de muestras que habían sido conservadas durante un largo período de tiempo (cuatro años), lo que consideramos de gran importancia, ya que pudiera ser un valioso instrumento para la realización de estudios retrospectivos de la enfermedad y análisis de evolución genética del virus.

Además, estos resultados corroboran una vez más la necesidad de contar con medios de diagnóstico que no tengan como factor limitante el uso de muestras frescas, como el aislamiento viral, la microscopía electrónica y las reacciones de inmunohistoquímica sobre cortes de tejidos, técnicas que en la actualidad forman parte de la batería diagnóstica de esta enfermedad (4).

Estos resultados indican que, a pesar de que la técnica posee una sensibilidad suficiente para detectar el virus en exudados rectales una vez iniciada la diarrea, en esta muestra se produce un incremento de partículas virales alrededor de 36 h después, lo cual le confiere más valor desde el punto de vista diagnóstico, por lo que podemos sugerir que la mejor muestra de exudado rectal para el desarrollo de esta técnica es la que se toma 36 a 48 horas después del inicio de la diarrea en los cerdos enfermos.

Nuestros resultados se corresponden con los obtenidos por Rodák y col. (27), quienes evaluaron la excreción del VGET en heces mediante un kit de ELISA de competición

de bloqueo (CB-ELISA, por sus siglas en inglés) y demostraron que el virus sigue excretándose con las heces durante más de siete días PI, pero las mayores concentraciones se detectan los días tres a cinco PI. Sánchez y col., (29) obtuvieron los títulos de producción vírica más elevados a partir de intestino delgado de cerdos los días dos a cuatro PI. Esto se justifica por el hecho de que el VGET se multiplica en los enterocitos de la región apical de las vellosidades intestinales, por lo que la muestra con más contenido viral es el homogenado de intestino, sobre todo yeyuno e íleon (35, 9).

Hasta la actualidad, solo conocemos el desarrollo de una prueba RT-PCR anidada para la detección del VGET (16). Estos autores emplearon esta prueba para diferenciar VGET y PRCV en muestras de exudados rectales y nasales mediante la amplificación de un segmento del gen *S*. En su investigación no indican el límite de detección de la técnica, pero evalúan la sensibilidad de la misma comparándola con la de un kit de diagnóstico ELISA de doble anticuerpo (anticuerpos monoclonales contra las proteínas *S* y *N*), y observan que esta prueba es capaz de detectar el virus en los exudados rectales de cerdos inoculados experimentalmente hasta el día 7 PI, mientras que con la RT-PCR anidada se puede detectar hasta el día 12 PI, lo cual confirma la sensibilidad y la versatilidad de esta técnica para detectar el virus en muestras de exudados rectales sin necesidad de sacrificar al animal.

La PCR anidada aquí descrita constituye una herramienta útil para la detección del VGET en cultivo de tejido y/o a partir de muestras clínicas. Esta técnica mostró parámetros de rendimiento calificados como buenos, lo que contribuirá a incrementar la eficiencia en el diagnóstico de la gastroenteritis transmisible del cerdo.



Mise au point d'une épreuve d'amplification en chaîne par polymérase nichée pour le diagnostic de la gastroentérite transmissible du porc

E. Rodríguez, A. Betancourt, D. Relova, C. Lee, D. Yoo & M. Barrera

Résumé

Les auteurs décrivent la mise au point d'une épreuve d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) nichée pour le diagnostic de la gastroentérite transmissible du porc. Les amorces ont été déterminées à partir des régions bien conservées de plusieurs séquences du virus utilisées pour l'étude. Lors de la PCR couplée à une transcription inverse, utilisant des amorces externes, un fragment de la taille attendue (441 pb) a été amplifié dans tous les échantillons, mais à très faible intensité. Lors de la deuxième amplification (PCR nichée), réalisée au moyen d'amorces internes, le fragment amplifié était de la taille attendue (168 pb), et sa concentration était correcte. Les performances de l'épreuve sur le virus isolé en culture tissulaire et dans des échantillons cliniques ont été jugées satisfaisantes pour le diagnostic virologique de la gastroentérite transmissible du porc.

Mots-clés

Amplification en chaîne par polymérase – Amplification en chaîne par polymérase couplée à une transcription inverse – Amplification en chaîne par polymérase nichée – Gastroentérite transmissible du porc.



Development of a nested polymerase chain reaction test for the diagnosis of transmissible gastroenteritis of pigs

E. Rodríguez, A. Betancourt, D. Relova, C. Lee, D. Yoo & M. Barrera

Summary

The aim of this study was to develop a nested polymerase chain reaction (nested PCR) for the rapid detection of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) of pigs. The primers were designed on the basis of highly conserved regions of several TGEV sequences included in the analysis. External primers were used to amplify a fragment of the expected size (441 bp) in all the samples evaluated using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), but with very low intensity. In the second amplification (nested PCR), internal primers were used to amplify a fragment of the expected size (168 bp), with good concentration. The performance of the test based on virus isolates in tissue culture and in clinical samples was judged good for the virological diagnosis of transmissible gastroenteritis of pigs.

Keywords

Nested polymerase chain reaction – Polymerase chain reaction – Reverse transcriptase polymerase chain reaction – Transmissible gastroenteritis of pigs.



Bibliografía

1. Benfield D.A., Jackwood D.J., Bae J.I., Saif L.J. & Wesley R.D. (1991). – Detection of transmissible gastroenteritis virus using cDNA probes. *Arch. Virol.*, **116** (1-4), 91–106.
2. Bock R. (1997). – Biolistic transformation of plants. Qiagen News.
3. Calvo E., Escors D., López J.A., González J.M., Álvarez A., Arza E. & Enjuanes L. (2005). – Phosphorylation and subcellular localization of transmissible gastroenteritis virus nucleocapsid protein in infected cells. *J. gen. Virol.*, **86**, 2255–2267.
4. Chen R., Huang W., Lin Z., Zhou Z., Yu H. & Zhu D. (2004). – Development of a novel real-time RT-PCR assay with LUX primer for the detection of swine transmissible gastroenteritis virus. *J. virol. Meth.*, **122**, 57–61.
5. Cho K.O., Hasoksuz M., Nielsen P.R., Chang, K.O., Lathrop S. & Saif L.J. (2001). – Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch. Virol.*, **146**, 2401–2419.
6. Costantini V., Lewis P., Alsop J., Templeton C. & Saif L.J. (2004). – Respiratory and faecal shedding of porcine respiratory coronavirus (PRCV) in sentinel weaned pigs and sequence of the partial S-gene of the PRCV isolates. *Arch. Virol.*, **149**, 957–974.
7. Coyne V.E., James M.D., Reid S.J. & Rybicki E.P. (2001). – Molecular Biology Techniques Manual. 3rd Ed. Disponible en: www.mcb.uct.ac.za/pcrconcn.htm (consultado el 23 mayo de 2006).
8. Enjuanes L. & Van Der Zeijst B. (1995). – Molecular basis of transmissible gastroenteritis virus epidemiology. In *The Coronaviridae* (Stuart G., coord.). Plenum Press, Nueva York.
9. Enjuanes L., Sola I., Alonso S., Escors D. & Zuniga S. (2005). – Coronavirus reverse genetics and development of vectors for gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **287**, 161–197.
10. Escors D., Ortego J., Laude H. & Enjuanes L. (2001). – The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability. *J. Virol.*, **75**, 1312–1324.
11. González J.M., Gómez-Puertas P., Cavanagh D., Gorbalenya A.E. & Enjuanes L. (2003). – A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. *Arch. Virol.*, **148**, 2207–2235.
12. Hiscox J.A., Wurm T., Wilson L., Britton P., Cavanagh D. & Brooks G. (2001). – The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *J. Virol.*, **75**, 506–512.
13. Innis M.A. & Gelfand D.H. (1990). – Optimization of PCRs. In *PCR Protocols, First Edition: A Guide to Methods and Applications* (Spiral-bound), (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, coord.). Academic Press, Inc, 3–11.
14. Jackson L. (2007). – Optimizing PCR protocols. Disponible en: www.jax.org. (consultado el 12 de Marzo de 2006).
15. Jung K. & Chae C. (2005). – RT-PCR-based dot blot hybridization for the detection and differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples using a non-radioactive digoxigenin cDNA probe. *J. virol. Meth.*, **123** (2), 141–146.
16. Kim L., Chang K.O., Sestak K., Parwani A. & Saif L.J. (2000). – Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs. *J. vet. diagn. Invest.*, **12** (4), 385–388.
17. Kim L., Hayes J., Lewis P., Parwani A.V., Chang K.O. & Saif L.J. (2000). – Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. *Arch. Virol.*, **145**, 1133–1147.
18. Kim O., Choi C., Kim B. & Chae C. (2000). – Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR. *Vet. Rec.*, **146** (22), 637–640.
19. Kim S.Y., Song D.S. & Park B.K. (2001). – Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J. vet. diagn. Invest.*, **13** (6), 516–520.
20. Kubota S., Sasaki O., Amimoto K., Okada N., Kitazima T. & Yasuhara H. (1999). – Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus. *J. vet. med. Sci.*, **61** (7), 827–830.
21. Kuo L. & Masters P.S. (2002). – Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus. *J. Virol.*, **76**, 4987–4999.
22. Kuulasmaa T. (2002). – Oligo Analyser Software. Version 1.2. Disponible en: www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware (consultado el 15 de abril de 2006).
23. Liu C., Kokuho T., Kubota T., Watanabe S., Inumaru S., Yokomizo Y. & Onodera T. (2001). – A serodiagnostic ELISA using recombinant antigen of swine transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *J. vet. med. Sci.*, **63** (11), 1253–1256.
24. Narayanan K., Maeda A., Maeda J. & Makino S. (2000). Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J. Virol.*, **74**, 8127–8134.

25. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2004). – Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines, Part 2, Section 2.6, Chapter 2.6.4. Disponible en: www.oie.int/eng/normes (consultado el 4 de marzo de 2007).
 26. Paton D. & Lowings P. (1997). – Discrimination between transmissible gastroenteritis virus isolates. *Arch. Virol.*, **142**, 1703–1711.
 27. Rodák L., Smíd B., Nevoránková Z., Valíček L. & Smítalova R. (2005). – Use of monoclonal antibodies in blocking ELISA detection of 28 transmissible gastroenteritis virus in faeces of piglets. *J. vet. Med.*, **52**, 105–111.
 29. Rychlik W., Spencer W.J. & Rhoads R.E. (1990). – Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, **18** (21), 6409–6412.
 30. Sánchez C.M., Izeta A., Sánchez-Morgado J.M., Alonso S., Sola I., Balasch M., Plana-Duran J. & Enjuanes L. (1999). – Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J. Virol.*, **73**, 7607–7618.
 31. Schultze B., Krempf C., Ballesteros M.L., Shaw L., Schauer R., Enjuanes L. & Herrler G. (1996). – Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity. *J. Virol.*, **70** (8), 5634–5637.
 32. Shoup D.I., Swayne D.E., Jackwood D.J. & Saif L.J. (1996). Immunohistochemistry of transmissible gastroenteritis virus antigens in fixed paraffin-embedded tissues. *J. vet. diagn. Invest.*, **8**, 161–167.
 33. Song D.S., Kang B.K., Oh J.S., Ha G.W., Yang J.S., Moon H.J., Jang Y.S. & Park B.K. (2006). – Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. *J. vet. diagn. Invest.*, **18**, 278–281.
 34. Takiuchi E., Stipp D., Alfieri A. & Alfieri A. (2006). – Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. *J. virol. Meth.*, **131**, 148–154.
 35. Tsunemitsu H., Smith D.R. & Saif L.J. (1999). – Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. *Arch. Virol.*, **144**, 167–175.
 36. Wesley R. & Lager K. (2003). – Increased litter survival rates, reduced clinical illness and better lactogenic immunity against TGEV in gilts that were primed as neonates with porcine respiratory coronavirus (PRCV). *Vet. Microbiol.*, **95**, 175–186.
 37. Wu D.Y., Ugozzoli L., Pal B.K., Qian J. & Wallace B. (1991). – The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol.*, **10**, 233–238.
 38. Yoon K.J. (1997). – PCR for detection and differentiation of TGEV and PRCV. Presentation to Enteric Diseases Committee, Annual meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Louisville, Kentucky.
 39. Zúñiga S., Sola I., Moreno J.L., Sabella P., Plana-Durán J. & Enjuanes L. (2007). – Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology*, **357**, 215–227.
-