

RESUMEN.

Se estudió mediante la técnica de RT-PCR anidada, las infecciones virales persistentes y congénitas causadas por el virus de la Peste Porcina Clásica (PPC) en muestras de tejidos de casos positivos de campo, tonsilas de cerdas gestantes descartadas con sus respectivas camadas y tonsilas de cerdas de descarte. Para la detección del ácido nucleico se emplearon oligonucleotidos para el gen de la glicoproteína E2, los cuales amplifican un fragmento de 270 pares de bases. A continuación, los amplificados fueron analizados mediante la técnica de RFLPs utilizando las enzimas de restricción Avall, BanII y PvuII y se clasificaron antigenicamente las muestras positivas con un panel de anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa. Se logró la amplificación del fragmento del gen de la glicoproteína E2 en 14 casos de campo de los 20 analizados. De igual modo, se obtuvo la amplificación en ocho muestras de tonsilas de cerdas, de las cuales seis amplificados pertenecían a las tonsilas obtenidas de las cerdas gestantes y dos de las tonsilas de cerdas de descarte. Al analizarse los casos positivos por RT-PCR anidada con el panel de

* Contribución del Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario Instituto Colombiano Agropecuario ICA-CEISA

** Respectivamente: 1. Bacterióloga Msc Fundación Santa Fe. 2. Médico Veterinario PhD UNAL. 3. Médico Veterinario Msc ICA. 4. Médico Veterinario ICA. 5. Médico Veterinario ICA. 5. Bacterióloga ICA.

E-mail: direccion.ceisa@ica.gov.co

nula de los productos de amplificación, lo que imposibilitó el agrupamiento de estos, a los patrones establecidos por esta enzima.

Palabras Claves: Peste Porcina Clásica, RT-PCR, Infecciones Persistentes y Congénitas.

DETECION OF CONGENITAL AND PERSISTENT INFECTION OF THE CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS *

SUMMARY.

Persistent infections and congenital disease caused by Classical Swine Fever Virus (CSFV) were studied using RT-nested PCR. For this purpose, tissues samples collected from positive field cases, tonsils from discarded gestating sows with their litter and other tonsils also from discarded sows were examined. In order to detect the viral nucleic acid a set of oligonucleotides primers directed to E2 gene were used to amplify a fragment of 270pb. Then, those amplified were cut with restriction enzymes to generate RFLP's. Positives samples were antigenically studied by using monoclonal antibodies conjugates with

* Contribución del Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario Instituto Colombiano Agropecuario ICA-CEISA

strains by monoclonal antibody. The PCR amplified were grouped within group 4 using the Avall enzyme and within group 1 by digestion with enzyme Pvull. It noticed a partial digestion when using BanII enzyme. The epidemiological significance of these findings is discussed.

Key Words: RT-PCR, CSFV, congenital infections

INTRODUCCIÓN

La peste porcina clásica, es una enfermedad viral altamente contagiosa del cerdo y económicamente importante para la industria porcícola en el mundo, se caracteriza por fiebre alta y hemorragias. La enfermedad puede cursar en forma aguda, crónica, subclínica o inaparente; dependiendo de la virulencia de la cepa, la dosis infectante del virus, así como de la edad, estado nutricional e inmunitario del cerdo (Hofmann y col., 2000).

El virus de la peste porcina clásica, es un pequeño virus ARN envuelto que pertenece al género pestivirus de la familia *Flaviviridae*, dentro de este género se incluyen además el virus de la diarrea viral bovina (DVB) y la enfermedad de las fronteras (EF)(Becher y col., 1999).

afecta la productividad de las granjas sino que limita las oportunidades para participar en los mercados internacionales de carne y subproductos de origen porcino.

Teniendo en cuenta que los planes de erradicación se deben fundamentar sobre un diagnóstico preciso que elimine la posibilidad de falsos positivos o negativos; se hace imprescindible utilizar técnicas de biología molecular, para el reconocimiento de porcinos infectados con cepas de baja virulencia, las cuales son difíciles de reconocer clínicamente o a través de pruebas convencionales, lo que constituye un foco residual del virus en el campo, siendo un riesgo para los propósitos de erradicación (Harding y col., 1996).

El objetivo del presente trabajo fue detectar infecciones congénitas y persistentes causadas por el virus de la Peste Porcina Clásica por medio de las técnicas de Inmunofluorescencia Directa (IFD), Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (RT-PCR anidada), Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs) e Inmunoperoxidasa Directa en muestras de tonsila obtenidas a partir de cerdas de descarte, tejidos fetales colectados

Muestras

El estudio de detección de la infección aguda se realizó en tejidos tales como: tonsila, ganglio, bazo y riñón de un animal inoculado experimentalmente por la vía intramuscular con 100DI₅₀ de una cepa del virus de la PPC (cepa Santander) empleada por el ICA para los estudios de evaluación de la vacuna. Además, se procesaron muestras de tonsila, ganglio, riñón y bazo de 20 casos de campo positivos a PPC por las técnicas de Inmunofluorescencia Directa e histopatología, las cuales fueron remitidas al Laboratorio Nacional de Diagnostico del ICA entre enero de 1997 y Junio del 2002. Para el estudio de las infecciones persistentes se colectaron las tonsilas de 49 cerdas gestantes de descarte y 158 cerdas, llevadas a las plantas de sacrificio de los frigoríficos de San Martín y Guadalupe en la ciudad de Bogotá. Las primeras fueron colectadas en el año 2000 y las segundas en el 2001 y conservadas a -70°C. Para el estudio de las infecciones congénitas se colectaron las camadas de las 49 cerdas de descarte gestantes muestreadas en el año 2001; en este experimento se procesaron muestras fetales de tonsila, bazo, ganglio y riñón. En fetos menores de 8 cm se hicieron pooles de órganos para lograr la cantidad apropiada de la muestra.

los cuales se procesaron siguiendo la metodología previamente estandarizada en el Laboratorio Nacional de Diagnostico Veterinario del ICA-CEISA, Bogotá.

Técnica RT-PCR anidada

Para la extracción del ARN viral se utilizó, el reactivo TRIZOL² adaptado según el método descrito por Chomczynsky y Sacchi (1987) y siguiendo las indicaciones del productor (Hofmann y col., 2000).

La síntesis del cADN del genoma viral de la Peste Porcina Clásica, fue realizada en un volumen de 20µl de una mezcla que contiene 5µl de ARN, 1µl de Hexameros al azar³ (30ng/ml), 1 µl de dNTP's³ (10mM), 4 µl de buffer 5X-RT³ , 0.5 µl de RNAsin³ (40U), 0.5 µl de la enzima transcriptasa reversa del Virus de la Leucemia murinica Moloney M-MLV³ (200U) y 8 µl de Agua-DEPC. El ARN viral fue inicialmente denaturado con los hexameros al azar a 70°C por 5 minutos y posteriormente se adicionó la mezcla de la transcripción reversa y fue llevada al termociclador GeneAmp PCR System 2400⁴ a 42°C por 1 hora, luego a 94°C por 5 y llevada finalmente a 4°C.

¹ Criostato-Minotome. International Equipment Company-Division Damon. USA

² Gibco BBL. Gaithersburg MD. USA

³ Promega Corporation. USA

⁴ Perkin Elmer. USA

A 3') los cuales amplifican un fragmento de 671 nucleótidos entre E1-E2 y oligonucleótidos internos E2c:(5' TCR WCA ACC AAY GAG ATA GGG 3') y E2d: (5' CAC AGY CCR AAY CCR AAG TCA TC 3') que amplifica un fragmento del gen de la glicoproteína E2 de 270 nucleótidos.

Luego se adicionaron 2µl de cADN a una mezcla que contenía 5µl de buffer 10X³, 3µl de MgCl₂³(25mM), 1µl de dNTP's³ (10mM), 1µl de los cebadores externos de cada región en diferentes reacciones, (10µM), 0.2µl de Taq Polimerasa³ (5U) y 36.8µl de Agua-DEPC, para un volumen final de 50 µl.

Para las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador GeneAmp PCR System 2400⁴, programado a 20 ciclos para la primera ronda, consistente de 1 minuto de denaturalización a 94°C, 1 minuto de anillamiento a 50°C y 1 minuto de extensión a 72°C.

La segunda ronda de la PCR, se llevo con las mismas condiciones de la premezcla, utilizando 2µl de los productos amplificados de la primera ronda, con los siguientes parámetros de amplificación, denaturación a 94°C durante 1 minuto, anillamiento a 60°C durante 1 minuto y la extensión a 72°C durante 1

⁵ Gibco Life Technologies. USA

al 2% teñido con 1.5 µl de Bromuro de Etidio⁶ (10mg/ml). Los productos de la PCR fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta⁷. Como marcador de peso molecular se utilizó 2µl de 100pb DNA leader³.

Técnica de Inmunoperoxidasa Directa

Para la clasificación y diferenciación de los casos positivos, se empleó un panel de anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa de rábano picante los cuales fueron obtenidos en el laboratorio de Lelystad (Holanda); Para esta técnica, se hicieron cortes en criostato¹ de riñón y tonsilas, los cuales tenían un grosor de 3µ. Las muestras fueron procesadas siguiendo la metodología descrita por el laboratorio productor.

La presencia de gránulos pardos rojizos en el citoplasma de las células epiteliales de las criptas de la tonsila y tubulos ascendentes del asa de henle en el riñón, indicaron el reconocimiento del virus por los respectivos conjugados, considerándose esta reacción como una prueba positiva.

BanII³ y PvuII³, descritas por Parchariyanon y col. (2000).

Para realizar este ensayo se tomaron 5µl del producto de amplificación del gen E2, se le adicionó 2µl de Buffer 10X³, 0.2µl de Suero Bovino Acetilado (BSA)³ (1mg/ml), 0.2 µl de la enzima correspondiente (AvaI, BanII y PvuII) y 12.6µl de agua-DEPC, para un volumen final de 20µl. A continuación se homogenizaron y se incubaron a 37°C durante 3 horas en un baño serológico⁸; después de la incubación se adicionó a la mezcla 2µl de buffer de carga 6X³ para realizar la electroforesis.

Los patrones de RFLP para cada enzima fueron establecidos teniendo en cuenta los tamaños de las bandas descritas por estos autores.

Las muestras fueron corridas en geles de agarosa al 4% con Nusieve⁹ 3:1 en buffer TBE 0.5X a 95V durante 90 minutos, utilizando como referencia de tamaño el marcador de peso molecular de 25pb DNA Step Ladder³.

anidado en las muestras de tejidos obtenidas del animal infectado experimentalmente con la cepa Santander de PPC usada como referencia nacional. Mediante esta estandarización se determinó la temperatura de hibridación de los oligonucleotidos utilizados determinándose una temperatura de anillamiento para oligonucleotidos externos de 50°C y de 60°C para los oligonucleotidos internos; así como la concentración óptima de los oligonucleotidos de 10 μ M.

En 14 de los 20 casos positivos analizados, se obtuvo la amplificación de un fragmento de 270pb del gen de la glicoproteína E2 en todos los tejidos analizados (Tabla 1). Siete de estos casos fueron colectados en el periodo comprendido entre 1997-2001, uno de Antioquia, tres de Cundinamarca y tres casos de Putumayo. Los siete restantes corresponden a casos detectados en el departamento Cundinamarca durante el primer semestre del 2002 (Fig. 1).

Mediante el análisis de los 14 productos de amplificación por medio de la técnica de RFLPs se obtuvo con la enzima Avall tres fragmentos de 132, 89 y 49 pb correspondiente al grupo cuatro y para la enzima Pvull un fragmento de

Depto.	N° casos estudiados	N° casos positivos por IFD	N° casos positivos por RT-PCR anidado	Patrones de RFLPs			N° casos positivos por IMP
				Avall	Pvull	Banll	
Antioquia	1	1	1	4	1	DP	1
Cund/marca	10	10	10	4	1	-	8
Putumayo	7	7	3	4	1	-	1
Valle del Cauca	1	1	-				
Nariño	1	1	-				
Total	20	20	14				10

DP: Digestión parcial

A través de la técnica de Inmunoperoxidasa Directa se clasificaron diez casos como cepas de campo, uno de Antioquia, ocho de Cundinamarca y uno de Putumayo (Tabla 1).

Detección de las infecciones persistentes

A través de la técnica de Inmunofluorescencia Directa, se detectaron cinco muestras positivas dentro de las tonsilas colectadas en el año 2000 y tres de las amígdalas colectadas en el año 2001, las cuales eran procedentes de

A partir de las muestras de amígdalas obtenidas de cerdas gestantes descartadas recolectadas en el año 2000, se logró la amplificación del fragmento del gen de la glicoproteína E2 en seis de las 49 muestras analizadas, y de las 158 tonsilas colectadas en plantas de sacrificio durante el año 2001, se obtuvo la amplificación en dos muestras. Estas cerdas de descarte, eran procedentes de granjas ubicadas en los departamentos de Antioquia (2), Boyacá (2) y Cundinamarca (1); sin embargo en tres animales no se pudo establecer su origen.

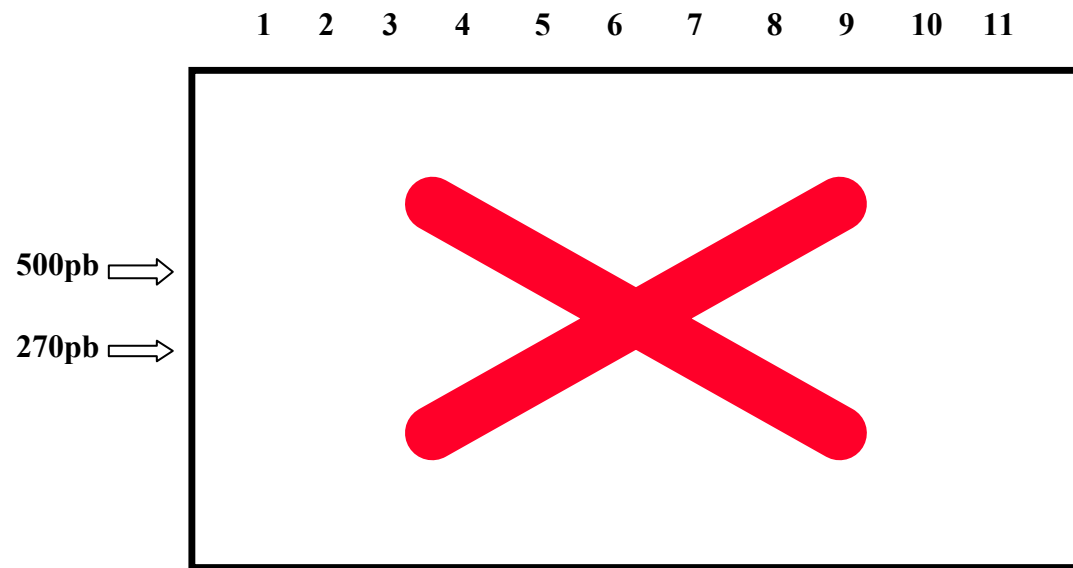


Figura 1. Producto de amplificación por RT-PCR anidado del virus de la peste porcina clásica de los casos de campo positivos del año 2002 con el gen E2. Línea 1, marcador de tamaño de 100pb. Línea 2, caso 3847.

3704 Zipaquirá(Cundinamarca). Línea 10, control negativo(Agua – DEPC).
Línea 11, control positivo.

Tabla 2. Resultados de la Inmunofluorescencia Directa, RT-PCR anidado, RFLPs e Inmunoperoxidasa Directa para la detección de las infecciones persistentes de las muestras de tonsila colectadas en el año 2000.

Depto	N° de muestr as Analiza das	N° muestras positivas por IFD	N° muestras positivas por RT-PCR	Patrones de RFLPs			N° muestras positivas por IMP
				Avall	Pvull	BanII	
Antioquia	2	1	1	4	1	DP	-
Boyacá	8	1	2	4	1	DP	-
Cundinamar ca	22	1	-				-
Santander	9	-	-				-
Otros	8	2	3	4	1	DP	-
Total	49	5	6				0

DP: Digestión parcial

Al analizar los productos de amplificación de estas ocho muestras mediante la técnica de RFLPs se obtuvo con la enzima Avall, tres fragmentos de 132, 89 y 49 pb siendo clasificados en el grupo cuatro, con la enzima Pvull un fragmento

la cual había sido colectada en el 2001 (Tabla 3).

Detección de las infecciones congénitas

No se logró detectar el antígeno viral mediante la prueba de Inmunofluorescencia Directa, ni amplificar el genoma viral a través de la técnica de RT-PCR anidada en los tejidos de tonsilas y riñón fetales de las 49 camadas examinadas.

Tabla 3. Resultados de la Inmunofluorescencia Directa, RT-PCR anidado, RFLPs e Inmunoperoxidasa Directa para la detección de las infecciones persistentes de las muestras de tonsila colectadas en el año 2001.

Departamento	N° de muestras analizadas	N° de muestras positivas por IFD	N° muestras positivas por RT-PCR anidado	Patrones de RFLPs			N° de muestras positivas por IMP
				Avall	Pvull	Banll	
Antioquia	78	3	1	4	1	-	1
Boyacá	15	-	-				-
Cundinamarca	33	-	1	4	1	-	-
Meta	2	-	-				-
Santander	14	-	-				-
Tolima	1	-	-				-
Otros	15	-	-				-
Total	158	3	2				1

DP: Digestión parcial

muestras de tonsila de cerdas de descarte, así como en tejidos obtenidos de animales con infección aguda.

En los estudios realizados por Lorena J y colaboradores, 2001 sobre la persistencia de cepas de baja virulencia se obtuvo la amplificación del fragmento del gen NS2-3 en muestras de tonsila de animales inoculados experimentalmente, resultados similares se obtuvieron en el presente trabajo utilizando cebadores que amplifican un fragmento del gen de la glicoproteína E2, el cual tiene un segmento con un grado de variabilidad alta lo cual ha permitido la realización de estudios filogenéticos sobre este virus (Paton y col., 2000; Van Rijn y col., 1997).

La amplificación de un fragmento del gen E2 del virus de PPC en las muestras de tonsilas de cerdas de descarte, permitió demostrar la presencia de infecciones virales persistentes en animales adultos de las granjas porcinas comerciales del país. Este resultado, sugiere la existencia de infecciones, asociadas a cepas del virus de la Peste Porcina Clásica de baja virulencia, que pueden estar ocasionando estados crónicos o atípicos de la enfermedad, no diagnosticados clínicamente (Gomez-Tejedor y Valenciano, 1994; Van Oirschot, 1980).

en su estructura antigénica o cuando el estado inmunitario de los animales de la granja es deficiente. Por otro lado, estas infecciones persistentes están asociadas a infecciones congénitas, ya que la madre portadora del virus es capaz de infectar al feto a través de la placenta; llevando a estados de inmunotolerancia o al nacimiento de lechones aparentemente sanos pero que desarrollan el Síndrome de retraso de crecimiento (Collins y col., 1999; Dahle y Liess, 1992; Van Oirschot, 1980).

La aplicación de técnicas inmunológicas, como la Inmunoperoxidasa directa, para la detección y clasificación de los pestivirus mediante el uso de anticuerpos monoclonales, permite determinar el tipo de cepa presente en una muestra, e inferir sobre el tipo de variante antigénica que está circulando en una granja o región. De acuerdo con los resultados de este estudio, su uso en cortes de tejido por congelación es particularmente eficiente en casos agudos de campo, sin embargo para la detección de infecciones persistentes en tonsilas de cerdas de descarte su aplicabilidad se ve más limitada probablemente por la escasa cantidad del antígeno viral en el tejido analizado o que cualquier cambio autolítico, que enmascara la presencia de los gránulos pardos rojizos que determinan que la prueba es positiva (Narita M y col., 2000; Martín de la Mulas y col., 1997). Además, es posible que los procesos de

esta técnica sobre cultivos celulares infectados (Kaden y col., 1999; Koenen y col., 1998).

Con relación a los resultados obtenidos con la técnica RFLP realizada a partir de los amplificadores del gen de la glicoproteína E2, no se logró agrupar los productos, de acuerdo con los patrones establecidos por Parchariyanon y col (2000). Con los resultados de las enzimas Avall y Pvull se logró solo una aproximación al genogrupo 1.1, pero al no haber digestión con la enzima BanII, resultó imposible corroborar esta clasificación. Una hipótesis, es que los sitios de corte de la enzima BanII descritos para las cepas asiáticas sean diferentes para los amplificadores colombianos y por lo tanto no se logran los mismos patrones descritos; es posible que la secuenciación de estos fragmentos ayude a explicar por que no se pudo cortar con la enzima BanII.

Finalmente, para el desarrollo de un programa oficial de erradicación de la PPC, se requiere contar con técnicas que permitan detectar las infecciones persistentes y congénitas, en las cuales el título viral es bajo, siendo una limitante para la aplicación de los métodos rutinarios de laboratorio. Con la estandarización de métodos moleculares para el estudio de las infecciones virales agudas y persistentes se cuenta en el país con pruebas diagnósticas

Los autores expresan su agradecimiento al Instituto Colombiano Agropecuario ICA-CEISA, a la Asociación Colombiana de Porcicultores y al Fondo Nacional de la Porcicultura por su apoyo para la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. Becher P., Orlich M., Kosmidou A., Konig M., Baroth M and Thiel HJ. Genetic diversity of pestiviruses: Identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262:64-71,1999.
2. Collins M E., Desport M and Brownlie J. Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. *Virology* 259:85-98, 1999
3. Dahle J and Liess B. A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 15: 203, 1992.
4. Gomez-Tejedor Ortiz C y Valenciano Martínez-Orozco M. Epizootiología y Patogenia de la Peste Porcina Clásica. *Aula Veterinaria* 22: 11-17, 1994.

6. Hofmann M. A., Thur B., Liu L., Gerber M., Stettler P., Moser C and Bossy S. Rescue of infectious classical swine fever and foot-and-mouth disease virus by RNA transfection and virus detection by RT-PCR after extended storage of samples in Trizol. J of Virological Methods 87:29-39, 2000.
7. Kaden V., Steyer H., Strebelow G., Lande E., Hubert P and Steinhagen P. Detection of low-virulent classical swine fever virus in blood of experimentally infected animals: comparison of different methods. Acta Virologica 43:373-380, 1999.
8. Koenen F., Vanderhallen H., Laevens H and Deluyker H. Serological and virological evolution of classical swine fever diagnosis after an experimental infection simulating field conditions. Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England. Pp. 191, 1998
9. Lorena J., Barlic-Maganja D., Lojkic M., Madic J., Grom J., Cac Z., Roic B., Terzic S. Lojkic I., Polancec D and Cajavec S. Classical swine fever

- Lecocq C and Sierra M A. Immunohistochemical detection of hog cholera viral glycoprotein 55 in paraffin-embedded tissues. J Vet Diagnostic Investigation 9:10-16, 1997.
11. Narita M., Kawashima K., Kimura K., Mickami O., Shibahara T., Yamada S and Sakoda Y. Comparative immunohistopathology in pigs infected with highly virulent or less virulent strains of hog cholera virus. Vet Pathol 37:402-408, 2000.
12. Parchariyanon A., Inui K., Pinyochon W., Damrongwatanapokin S and Takahashi E. Genetic grouping of classical swine fever virus by restriction fragment length polymorphism of the E2 gene. J of Virology Methods 87:145-149, 2000.
13. Paton D.J., McGoldrick A., Greiser-Wilke I., Parchariyanon S., Song J.Y., Liou P.P., Stadejek T., Lowings J.P., Björklund H and Belák S. Genetic typing of classical swine fever virus. Vet Microbiol 73:137-157, 2000.

15. Van Rijn P., Van Gennip H.G., Leendertse C.H., Bruschke C.J., Paton D.J., Moorman R.J and Van Oirschot J.T. Subdivision of the pestivirus genus, based on envelope glycoprotein E2. *Virology* 237(2): 337-348, 1997.