

Detección mediante RT-PCR en tiempo real del virus vacunal en cerdos inmunizados con la vacuna cubana contra la peste porcina clásica

Tania Campos-Cuello,* Laura Coroas-González, Livany Martínez-Rodríguez

Grupo Empresarial LABIOFAM. Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas. Ave. Independencia km 16½ Santiago de las Vegas. Boyeros, La Habana, Cuba.

email: esp1.desarrolloup7@labiofam.co.cu, taniacampo@infomed.sld

La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad viral infectocontagiosa, producida por un virus ARN del género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae*. En la actualidad es una de las causas de pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial. En su prevención se han utilizado vacunas vivas atenuadas, empleando la cepa China lapinizada. La Reacción en Cadena de la Polimerasa Reverso Transcriptasa (RT-PCR) ha sido uno de los métodos más sensibles aplicado en Medicina Veterinaria para la detección de virus ARN. En el caso del virus de la PPC es muy útil porque el ácido nucleico se puede detectar desde muy temprano en la infección y en periodos más largos en aquellos animales que se recuperan. El objetivo de este estudio fue aplicar la técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección de la cepa China lapinizada de la vacuna cubana contra la PPC. Las tonsilas de los cerdos vacunados fueron el órgano más positivo en la detección del ARN del virus vacunal. Los resultados obtenidos evidenciaron una interferencia del virus vacunal en el diagnóstico, siendo el día 12 posvacunación en el que se obtiene una emisión umbral de fluorescencia más bajo.

Palabras claves: peste porcina clásica, vacunas vivas atenuadas, cepa China lapinizada, RT-PCR.

Introducción

La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad viral infectocontagiosa, que produce una elevada morbilidad. Es causa de grandes pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial. La PPC es producida por un virus del género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae*, que incluye además al virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y el virus de la enfermedad de la frontera (BDV).

El genoma ARN que lo constituye es de cadena sencilla y polaridad positiva, con un peso de 12,2 kb, tiene un marco abierto de lectura (ORF- Open Reading Frame) que codifica 3898 aminoácidos de 435 kDa y en la parte terminal de 11 a 12 productos finales de clivaje (NH2-Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4BNS5A-NS5BCOOH) a través de un proceso co y postransduccional (1).

En la prevención de la enfermedad se han utilizado vacunas vivas atenuadas empleando la cepa China lapinizada, que procede de un aislamiento de campo que fue atenuado tras repetidos pases sucesivos en conejos y no presenta virulencia residual, siendo totalmente apatógena incluso para madres gestantes y lechones. Tiene una rápida actividad protectora al inducir

inmunidad y presenta interferencia viral con el virus patógeno.

Los animales inmunizados con la cepa China desarrollan únicamente fiebre moderada y una breve viremia, existiendo poca o ninguna probabilidad de que la cepa China haga reversión a virulencia cuando es sometida a pasajes en cerdos, lo cual garantiza su seguridad en el uso frecuente en campo (2, 3).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa Reverso Transcriptasa, conocida como RT-PCR por sus siglas en inglés, ha sido uno de los métodos más sensibles para la detección del virus de PPC, porque el ácido nucleico se puede detectar desde muy temprano en la infección y en periodos más largos en aquellos animales que se recuperan.

Después de la extracción del ARN a partir de las muestras, este debe ser transcrito a un ADN complementario (ADNc) para ser amplificado por la RT-PCR, siendo este método aplicado en Medicina Veterinaria para la detección de varios virus ARN (4).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este estudio fue detectar mediante la técnica de RT PCR en tiempo real el virus vacunal de la vacuna cubana contra la PPC.

* Dra. en Medicina Veterinaria, Máster en Virología.

Materiales y Métodos

Cepas vacunales, medios y condiciones de cultivo

Virus vacunales utilizados:

- Lote de vacuna cubana con cepa China lapinizada, replicado en conejos con un título viral de 10^5 dosis infectiva media en conejo (DICON_{50%}/2mL) procedente de la empresa productora de vacunas virales y bacterianas, grupo empresarial LABIOFAM (La Habana, Cuba), que fue previamente evaluado por el Laboratorio de Control Estatal del Instituto de Medicina Veterinaria de Cuba. Se estableció que la dosis/cerdo equivale a 100 dosis protectoras.
- Vacuna Pestiffa®, de Merial utilizando como control positivo la dosis/cerdo recomendada por el fabricante.

Animales: 18 cerdos domésticos de 6 semanas de edad (Seronegativos a virus de la PPC (VPPC), VDVb y BDV) de la raza Landrace x Large White.

Vacunación: Se vacunaron intramuscularmente 16 animales con 2 mL de la vacuna en la tabla del cuello (identificados del 1 al 16), utilizando una jeringuilla por animal con aguja 18 G x 3/4-1 pulgadas y los otros 2 animales se utilizaron como controles negativos (números 17 y 18).

Recolección de muestras: Se colectaron muestras de hisopos nasales, hisopos bucales, hisopos rectales, sueros y órganos: tonsilas, linfonodo PRE-escapular (punto de inoculación), pulmón, riñón.

Técnica RT PCR utilizada:

- RT-PCR en tiempo real para la detección del ARN del virus vacunal: cepa China lapinizada de VPPC, utilizando el sistema TaqMan con sonda y cebadores estandarizados en el Centro de Investigaciones de Salud Animal de Barcelona (CRESA) (5).
- RT-PCR en tiempo real para la detección del ARN de VPPC (técnica recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), para el diagnóstico de la PPC), con el propósito de descartar posibles contaminaciones con otros *pestivirus*, descrita por Hoffman (6).

Diseño experimental: La eutanasia de todos los animales se realizó teniendo en cuenta las exigencias instituidas en el Comité Ético de Experimentación Animal, diseñado en CRESA según los requerimientos establecidos en la Comisión de Experimentación Animal de Cataluña, la cual sigue los requisitos previstos en el Real Decreto 1201/2005. Se eutanasiaron por método físico dos de

los animales vacunados a los: 4, 8, 12, 17, 22, 26 y 30 días posvacunación y los cerdos controles antes de la vacunación del resto de los animales.

Extracción del ARN: Las muestras de sueros e hisopos (los hisopos fueron procesados en 500 µL de amortiguador fosfato salino al 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco)) fueron utilizados directamente en la extracción de ARN, utilizando el kit NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de órganos fueron procesadas utilizando la proporción de 1 g de órgano en 10 mL de RPMI (Gibco) (4). Como control positivo se incluyó la vacuna con cepa China (Pestiffa®, de Merial) utilizando la dosis/cerdo recomendada por el fabricante. Las condiciones para la reacción fueron similares a las descritas (5).

Análisis de datos: El análisis estadístico se ejecutó empleando el Programa GraphPad Prism (versión 5). Se realizó una estadística descriptiva, calculando la media y desviación estándar de los datos obtenidos con el propósito de analizar la sensibilidad de ambas técnicas de RT-PCR en tiempo real.

Resultados y Discusión

El RT-PCR en tiempo real es el método de elección en muchos laboratorios con aplicaciones en el diagnóstico. Dicha tecnología adopta los aspectos químicos de la reacción en cadena de la polimerasa con el uso de moléculas fluorescentes para monitorear la amplificación de los productos en cada ciclo de reacción. Esta combinación brinda una excelente sensibilidad y especificidad, posibilidad de reproducibilidad de los datos, bajo riesgo de contaminación y reduce el tiempo de reacción (7).

Los ensayos de RT-PCR en tiempo real han sido aplicados en la Medicina Veterinaria para la detección de ARN de varios virus, teniendo en cuenta que es una técnica muy sensible y específica y el ensayo con sonda TaqMan utilizado para la detección de virus vacunales con cepa china lapinizada tiene una alta sensibilidad, pudiendo detectar un mínimo de 10 copias del genoma por reacción.

Al estandarizar la técnica de RT-PCR en tiempo real basada en sonda TaqMan para la detección de ARN de cepas vacunales lapinizadas de VPPC en nuestro laboratorio, se consideraron como positivos los resultados de CT igual o menor que 42. Las muestras en las que la fluorescencia era indetectable fueron asumidas como negativas. Los valores de emisión de

fluorescencia (CT por sus siglas en inglés) entre 10 y 23 se contemplaron como alta carga de ARN viral; del 24 al 29 moderada y 30-42 baja carga de ARN viral, según lo reportado (5).

Se detectó un bajo nivel de ARN del virus vacunal hasta la dilución 10^{-2} con un CT de 33,99. Se secuenció la zona del genoma que amplifica esta reacción de la vacuna cubana cepa China lapinizada, evidenciándose que tiene un alto porcentaje de homología nucleotídica (99%) con la cepa Harbin, (código AY805221 del Gene Bank).

Las cepas virales de vacunas atenuadas con cepa China contra la PPC, pueden persistir en sangre o tejidos de los animales vacunados por largos periodos de tiempo postinmunización (3). En nuestro ensayo se observó baja carga de ARN viral en las muestras de suero de cinco animales vacunados, a los 4, 8 y 12 días posvacunación (Tabla 1).

Investigaciones similares detectaron muestras de sangre positivas en animales vacunados con dos vacunas con cepa China, obtenida en conejos y en células MPK

Tabla 1. Resultados de los CT de ARN en muestras de sueros de animales vacunados y los controles no vacunados.

No de los animales	Días posvacunación	CT
1	1	Negativo
2	1	Negativo
3	4	39,34
4	4	40,1
5	8	39,06
6	8	Negativo
7	12	40,41
8	12	40,05
9	16	Negativo
10	16	Negativo
11	22	Negativo
12	22	Negativo
13	26	Negativo
14	26	Negativo
15	30	Negativo
16	30	Negativo
17	No vacunados	Negativo
18	No vacunados	Negativo

respectivamente, hasta los 16 días posvacunación, utilizando la técnica de Nested RT-PCR (8).

Nuestros resultados coinciden además con ensayos realizados en el año 2011 en Europa, ya que al utilizar la técnica de RT-qPCR se observó positividad en dos animales a los 7 días de inmunizados con una vacuna viva atenuada (C strain "Riems") a los que se le detectaron valores de CT de 37,7 y 37,9, manteniéndose un cerdo con esa positividad a los 14 y 21 días posvacunación (9).

Las muestras de hisopos nasales, bucales y rectales de los animales vacunados resultaron negativas, excepto en tres cerdos, en los que se detectó en hisopos nasales una baja carga de ARN viral a los 8, 12 y 16 días posvacunación (Tabla 2).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio coinciden con una investigación realizada en Colombia en el año 2011 a dos vacunas contra PPC con cepa China, donde detectaron la presencia del ácido nucleico del virus vacunal en hisopos nasales y rectales en dos animales vacunados (10). Por el contrario, no coinciden con un artículo previo publicado en Europa donde no se encontraron evidencias de ARN del virus vacunal utilizando una reacción de RT-qPCR cuantitativo en este tipo de muestras, en cerdos vacunados con una vacuna viva atenuada y dos vacunas marcadoras que tienen como principio activo la cepa China (9).

En las tonsilas de los animales vacunados se detectó moderada carga de ARN viral entre los 4 y 30 días posvacunación, siendo de moderada a baja entre 4 y 8 días posvacunación en linfonodos preescapular y pulmón (ambos en solo tres animales) y negativo en riñón (Tabla 3). Los animales no vacunados sacrificados el día de la vacunación resultaron negativos.

Estos resultados corroboran estudios previos, que demuestran la persistencia del virus vacunal en la tonsila de los cerdos (11). Otros investigadores (12) demostraron que la replicación de la cepa China está limitada al tejido linfóide y ocasionalmente en otros tejidos como riñón, pero excede su permanencia a tres semanas en la tonsila, siendo sus resultados similares a los obtenidos en nuestro ensayo.

Desde la década del 70 se ha reportado que el virus vacunal se replica en tonsilas hasta 2 a 3 semanas posvacunación y que la inmunización con cepa China en forma oral ha sido segura y efectiva; no detectándose virus vacunal en las secreciones nasales, ni en materia fecal, entre los 2-12 días posvacunación, pero puede aparecer en órganos (tonsila, nódulos linfoides mandibulares y bazo)

Tabla 2. Resultados de los CT de ARN en muestras de hisopos nasales, bucales y rectales de animales vacunados y los controles no vacunados.

Animales	Días posvacunación	Resultados de CT		
		Hisopos nasales	Hisopos bucales	Hisopos rectales
1	1	Negativo	Negativo	Negativo
2	1	Negativo	Negativo	Negativo
3	4	Negativo	Negativo	Negativo
4	4	Negativo	Negativo	Negativo
5	8	Negativo	Negativo	Negativo
6	8	40,67	Negativo	Negativo
7	12	Negativo	Negativo	Negativo
8	12	41,8	Negativo	Negativo
9	16	Negativo	Negativo	Negativo
10	16	38,78	Negativo	Negativo
11	22	Negativo	Negativo	Negativo
12	22	Negativo	Negativo	Negativo
13	26	Negativo	Negativo	Negativo
14	26	Negativo	Negativo	Negativo
15	30	Negativo	Negativo	Negativo
16	30	Negativo	Negativo	Negativo
17	No vacunados	Negativo	Negativo	Negativo
18	No vacunados	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 3. Resultados de la RT-PCR en tiempo real en muestras de órganos de cerdos vacunados.

Animales	Días posvacunación	Resultados de CT			
		Tonsila	Linfonodo	Pulmón	Riñón
1	1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	4	27,19	40,9	36,49	Negativo
4	4	28,15	28,69	36,08	Negativo
5	8	29,35	31,13	34,46	Negativo
6	8	27,9	Negativo	Negativo	Negativo
7	12	23,22	Negativo	Negativo	Negativo
8	12	22,82	Negativo	Negativo	Negativo
9	16	30,91	Negativo	Negativo	Negativo
10	16	28,32	Negativo	Negativo	Negativo
11	22	26,27	Negativo	Negativo	Negativo
12	22	26,07	Negativo	Negativo	Negativo
13	26	26,52	Negativo	Negativo	Negativo
14	26	31,46	Negativo	Negativo	Negativo
15	30	29,95	Negativo	Negativo	Negativo
16	30	26,66	Negativo	Negativo	Negativo
17	No vacunados	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	No vacunados	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

hasta 8 días posvacunación en cerdos domésticos y únicamente en tonsila hasta 9 días posvacunación en cerdos salvajes (8).

Se ha detectado el genoma del virus cepa China en tonsilas hasta los 42 días en animales vacunados intramuscularmente mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real (3), siendo estos resultados similares a los nuestros, donde detectamos ARN del virus vacunal en tonsilas hasta 30 días posvacunación.

Utilizamos además la técnica de RT-PCR en tiempo real recomendada por la OIE, para poder establecer una comparación con la técnica desarrollada para la detección del ARN del virus vacunal, teniendo en cuenta que en su estandarización se incluyeron cebadores y sonda TaqMan y que se demostró en 78 cepas del VPPC diferentes, que los oligonucleótidos, en la mayoría de los casos, tenían una homología perfecta en su secuencia y sólo un pequeño grupo de aislamientos presentaban diferencias (5, 6).

En nuestra investigación se procesaron por RT-PCR en tiempo real las muestras de tonsilas de los cerdos

Tabla 4. Resultados de RT PCR en tiempo real en muestras de tonsilas de animales vacunados, mediante la técnica de Liu y la de Hoffman.

No de los animales	Días posvacunación	Resultados de CT en las muestras de tonsila	
		Técnica de Liu	Técnica de Hoffman
1	1	Negativo	Negativo
2	1	Negativo	Negativo
3	4	27,19	29,82
4	4	28,15	30,92
5	8	29,35	32,51
6	8	27,9	31,32
7	12	23,22	28,25
8	12	22,82	28,76
9	16	30,91	34,83
10	16	28,32	34,39
11	22	26,27	30,5
12	22	26,07	31,02
13	26	26,52	31,15
14	26	31,46	35,56
15	30	29,95	34,06
16	30	26,66	31,46
17	No vacunados	Negativo	Negativo
18	No vacunados	Negativo	Negativo

vacunados, ya que fue el órgano más positivo en la detección del ARN del virus vacunal, utilizando la técnica descrita por Liu (5) y la de Hoffman (6). Se detectó con ambas técnicas ARN viral entre los 4 y 30 días posvacunación, por lo tanto interferencia del virus vacunal en el diagnóstico. El CT más bajo se detectó el día 12 (Tabla 4).

Por otro lado, si comparamos los resultados obtenidos con la técnica reportada por Liu (5), con respecto a los de Hoffman y cols (6), observamos que con el RT-PCR del primero, se obtienen menores valores, lo que indica que es mayor su sensibilidad y especificidad. Resultados previstos, teniendo en cuenta que esta técnica es específica para la cepa vacunal evaluada (cepa China lapinizada), mientras el ensayo de Hoffman está diseñado para detectar todas las cepas de PPC (6, 13).

Debe tenerse en cuenta que en algunos casos la presencia de ARN viral, procedente del uso de vacunas vivas, puede representar un inconveniente en el control de la PPC.

Conclusiones

Con la técnica RT-PCR en tiempo real desarrollada por Liu y colaboradores, se pudo demostrar la presencia del ARN del VPPC vacunal con la cepa China lapinizada en las muestras de suero, hisopos, tonsilas, pulmón, linfonodo preescapular y riñón de los cerdos tras la vacunación.

Se comprobó que con la técnica de detección del ARN del VPPC reportada por Hoffmann y colaboradores, es mayor el riesgo de enmascaramiento del diagnóstico de la enfermedad.

Referencias

1. Fernandez-Sainz I, Gladue D P, Holinka L, O Donnell V, Gudmundsdottir I, Prarat MV, et al. Mutations in Classical Swine Fever Virus NS4B. Affect Virulence in Swine. *Journal of Virology* 2010;84(3):1536-49.
2. Kortekaas J, Vloet RPM, Weerdmeester K, Ketelaar J, Van Eijk M, Loeffen WL. Rational design of a classical swine fever C-strain vaccine virus that enables the differentiation between infected and vaccinated animals. *Journal of Virological Methods* 2010;163(2):175-85.
3. Koenig P, Hoffmann B, Depner KR, Reimann I, Teifke JP, Beer M. Detection of classical swine fever vaccine virus in blood and tissue samples of pigs vaccinated either with a conventional C-strain vaccine or a modified live marker vaccine. *Vet Microbiol* 2007;120(3-4):343-51.
4. Tarradas J, Monsó M, Muñoz M, Rosell R, Fraile L, Frías MT, et al. Partial protection against classical swine fever virus elicited

- by dendrimeric vaccine-candidate peptides in domestic pigs. *Vaccine* 2011;29:4422-9.
5. Liu L, Xia H, Everett H, Sosan O, Crooke H, Meindl-Böhme A, et al. A generic real-time TaqMan assay for specific detection of lapinized Chinese vaccines against classical swine fever. *Journal of Virological Methods* 2011;75:170-4.
 6. Hoffmann Beer M, Schelp C, Schirrmeier H, Depner K. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *Journal of Virological Methods* 2005;130:36-44.
 7. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* 2015;439:231-50.
 8. Lorena J, Barlic-Maganja D, Lojkić M, Madić J, Grom J, Cac Z, et al. Classical swine fever virus (C-strain). Distribution in organ samples of inoculated piglets. *Vet Microbiol* 2001;81(1):1-8.
 9. Blome S, Aebischer A, Lange E, Hofmann M, Leifer I, Loeffen W, et al. Comparative evaluation of live marker vaccine candidates “CP7_E2alf” and “flc11” along with C-strain “Riems” after oral vaccination. *Vet Microbiol* 2012;158(1-2):42-59.
 10. Piñeros-Duque RJ. Evaluación de la respuesta postvacunal a Peste Porcina Clásica por medio de diferentes pruebas diagnósticas en cerdos desafiados experimentalmente. (Tesis de Maestría en Microbiología). Bogotá: Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia; 2011.
 11. Kaden V, Lange B. Oral immunization against classical swine fever (CSF): onset and duration of immunity. *Vet Microbiol* 2001;82(4):301-10.
 12. Leifer I, Depner K, Blome S, Le Potier MF, Le Dimna M, Beer M, et al. Differentiation of C-strain “Riems” or CP7 E2alf vaccinated animals from animals infected by classical swine fever virus field strains using real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 2009;158(1-2):114-22.
 13. Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual Estándar. Peste Porcina Clásica. Cap. 2.8.3. Paris: OIE; 2014.

Detection by real time RT-PCR of the vaccine virus in pigs immunized with the Cuban vaccine against classical swine fever

Abstract

Classical swine fever (CSF) is a highly contagious viral disease caused by a RNA virus that belongs to the genus *Pestivirus* within the family *Flaviviridae*. CSF represents one of the leading worldwide threats to the pig industry. Life attenuated vaccines using lapinized Chinese strain have been used to prevent the disease. The reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is one of the more sensitive methods that have been used in veterinary medicine for RNA virus detection. In the case of CSF virus is very useful, because the nucleic acid could be detected in early stages of the infection and during a long period in recovered animals. The aim of this study was to apply real time RT-PCR assay for the detection of lapinized Chinese strain from the Cuban vaccine strain against CSF. Tonsils of vaccinated pigs were the most positive organ in the detection of RNA vaccinal virus. Interference of the vaccinal virus in diagnosis was proved. The lower threshold cycle values were seen at 12 postvaccination day.

Keywords: classical swine fever, life attenuated vaccines, lapinized Chinese strain, RT-PCR.

Recibido: Junio de 2015

Aceptado: Diciembre de 2015