

## ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA RT-PCR CUALITATIVA EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA CLÁSICA

### STANDARDIZATION AND VALIDATION OF QUALITATIVE REAL TIME RT-PCR FOR DETECTION OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS

Kim Lam Chiok C.<sup>1</sup>, Alberto Manchego S.<sup>1,2</sup>, Hermelinda Rivera G.<sup>1</sup>, Nieves Sandoval Ch.<sup>3</sup>, Mercy Ramírez V.<sup>1</sup>

#### RESUMEN

Se estandarizó y validó la técnica de Transcriptasa Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-T-PCR) en tiempo real para el diagnóstico de la Peste Porcina Clásica (PPC). Se utilizó extractos de tonsilas y nódulos linfáticos de porcinos positivos (n=36) y negativos (n=30) a PPC mediante inmunofluorescencia (IF). La extracción de ARN viral, síntesis del ADN complementario y PCR en tiempo real se realizaron utilizando kits comerciales. Se utilizaron tres pares de cebadores para amplificar una región conservada (5' UTR) del virus PPC (VPPC) y del panpestivirus (virus de la DVB y EF) y una región codificante de la proteína E2 del VPPC frente a cepas de referencia del VPPC Alfort/187, Brescia y cepa China vacunal como controles positivos y cepas de los virus diarrea viral bovina, enfermedad de la frontera y rotavirus porcino como controles negativos. El 83.3 ± 12.3% (30/36) de las muestras positivas al VPPC por IF resultaron positivas al aislamiento y el 96.7 ± 3.3% (29/30) de las muestras negativas al VPPC por IF fueron negativas al aislamiento. Los resultados de la técnica de RT-PCR en tiempo real se determinaron mediante el análisis de las curvas de amplificación y disociación entre los controles positivos, negativos y las muestras de tejidos positivos y negativos al VPPC. Los cebadores E2 del VPPC dieron mejores resultados al reconocer los controles positivos y negativos. La técnica RT-PCR en tiempo real fue capaz de detectar al menos 4.28 pg de ARN de la cepa Brescia de la PPC. La validación se realizó comparando los resultados de las muestras positivas y negativas al aislamiento viral con los resultados de la RT-PCR en tiempo real. La prueba tuvo una sensibilidad de 96.8 ± 6%, y especificidad de 82.9 ± 12%, un valor predictivo positivo de 83.3 ± 12.3%, y negativo de 96.7 ± 3.3%. La técnica RT-PCR en tiempo real es una herramienta diagnóstica con alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la PPC.

**Palabras clave:** porcino, virus de la peste porcina clásica, VPPC, RT-PCR en tiempo real, aislamiento viral, validación

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, <sup>3</sup> Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos

<sup>2</sup> E-mail: amanchegos@unmsm.edu.pe

## ABSTRACT

A real time RT-PCR assay was standardized and validated for detection of classical swine fever virus (CSFV). Tonsil tissue and lymph nodules that were positive (n=36) and negative (n= 30) to CSFV by immunofluorescence test (IF) were selected. The viral RNA extraction, the complementary DNA (cDNA) synthesis and real time RT- PCR were performed using commercial kits. Three sets of primers were tested for amplification of a conserved region (5'UTR) of panpestivirus and 5'UTR Chinese strain and the E2 glycoprotein region (E2 PPC) against reference strains of CSFV: Alfort/187, Brescia, and a vaccine Chinese strain as positive controls, and strains of the bovine viral diarrhea virus, border disease virus and porcine rotavirus as negative controls. The 83.3 ± 12.3% (30/36) of positive samples to CSFV by IF test was positive for virus isolation and the 96.7 ± 3.3% (29/30) of negative samples to CSFV by IF was negative for virus isolation. The results of real time RT-PCR assay were determined by the analysis of cycle threshold (Ct) and temperature of melting (Tm) values between the positive and negative controls and the positive and negative to CSFV of field samples. The primer E2 of CSFV recognized all positive and negative controls. The real time RT-PCR assay detected at least 4.28 pg of RNA of CSFV Brescia strain. The validation of the real time RT-PCR was performed comparing the results of positive and negative to CSFV by isolation test and the results of real time RT-PCR assay. The real time RT-PCR assay had a sensitivity of 96.8 ± 6%, specificity of 82.9 ± 12% and a predictive positive and negative value of 83.3 ± 12.3% and 96.7 ± 3.3% respectively. The real time RT-PCR assay has a high sensitivity and specificity for the diagnosis of CSFV.

**Key words:** porcine, classical swine fever virus, CSFV, real time RT-PCR, virus isolation, validation

## INTRODUCCIÓN

El virus de la peste porcina clásica (PPC) pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Pestivirus*. El virus de la PPC (VPPC) está genéticamente y antigénicamente relacionado a los virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y enfermedad de la frontera (VEF), por lo que los anticuerpos inducidos por estos agentes presentan reacciones cruzadas en pruebas serológicas y de aislamiento viral (Lorena *et al.*, 2001; Risatti *et al.*, 2005).

El genoma del VPPC es RNA de polaridad positiva, pesa alrededor de 12.3 Kb y está compuesto por una región 5'UTR altamente conservada, una región ORF que codifica una poliproteína de 3898 aminoácidos que es procesada *co* y *post* traducción, y una **región 3'UTR** (Moser *et al.*, 1999).

El virus es específico para suinos y está considerado en la lista A de la OIE (Van Oirschot, 2003), lo que implica el veto a la exportación de carne y subproductos de origen porcino en países donde la enfermedad está presente. El virus ocasiona varios tipos de presentaciones clínicas de la enfermedad, oscilando entre la presentación hiperaguda a una presentación congénita (Mendoza *et al.*, 2005). Los animales infectados congénitamente son portadores del virus pero finalmente desarrollan la enfermedad o mueren debido a una infección secundaria viral o bacteriana. La inmunosupresión es un signo primordial, que determina la infección masiva de los animales en la explotación y el mantenimiento del virus en animales portadores, haciendo difícil su erradicación.

La vacunación contra la PPC ha sido prohibida en la Unión Europea debido a la dificultad de discriminar los anticuerpos

vacunales de los producidos por virus de campo mediante pruebas serológicas (Moennig *et al.*, 2003). En el país, la vacunación se realiza de manera compulsiva y sin supervisión del organismo encargado del control y erradicación de la enfermedad. La vacuna empleada es a base de la cepa china, tanto lapinizada como propagada en cultivo celular (Van Oirschot, 2003).

Los métodos diagnósticos incluyen técnicas inmunohistoquímicas como la inmunofluorescencia directa, inmunoperoxidasa y varios tipos de ELISA, siendo el aislamiento-inmunoperoxidasa la técnica de oro para el diagnóstico definitivo (Lin *et al.*, 2005). Desafortunadamente, las técnicas serológicas no consiguen discernir entre anticuerpos de animales vacunados frente a anticuerpos producidos por virus de campo.

Las publicaciones científicas sobre la PPC en las últimas décadas muestran los resultados de las investigaciones sobre el desarrollo de vacunas de nueva generación y sobre herramientas diagnósticas basadas en la ingeniería genética. Se han descrito varios tipos de RT-PCR, e incluso se han diseñado y evaluado kits comerciales de RT-PCR para el diagnóstico del VPPC (Risatti *et al.*, 2005; Le Dimna *et al.*, 2008).

Actualmente, la técnica molecular RT-PCR en distintas versiones (convencional, multiplex, en tiempo real cualitativa y cuantitativa) está siendo evaluada y estandarizada para uso rutinario diagnóstico en Europa (Paton y Greiser-Wilke, 2003). La técnica de RT-PCR en tiempo real es altamente sensible y específica, no requiere de manipulación post PCR, los resultados son presentados en tiempo real en la computadora y la cuantificación es posible gracias a las tecnologías de fluorescencia y detección continua, adaptaciones de la técnica convencional (Espy *et al.*, 2006). Esta técnica permite la diferenciación certera entre los miembros del género Pestivirus (Wirz *et al.*, 1993) y de la Peste Porcina Africana (Agüero *et al.*, 2004) de manera rápida e inequívoca.

La versión anidada en tiempo real, validada por Risatti *et al.* (2005), se ha difundido rápidamente debido a su alta sensibilidad y especificidad, y la posibilidad de detectar animales positivos antes de la presentación de signos clínicos y sólo tres días después de la primo infección.

La PPC es una de las enfermedades de la especie porcina de gran impacto económico y social, por lo que las organizaciones internacionales, nacionales, centros de investigaciones científicas, y laboratorios de diagnóstico, entre otros, realizan esfuerzos para controlar las enfermedades a nivel mundial. Un componente importante para el control de la PPC es el laboratorio equipado con técnicas que poseen alta sensibilidad y especificidad diagnóstica (Belák, 2007).

En el Perú, la técnica disponible en los laboratorios de diagnóstico de la PPC es la inmunofluorescencia (IF), una técnica que por su baja sensibilidad requiere de otras con mayor sensibilidad y rapidez como las pruebas moleculares, por lo que el objetivo del presente estudio fue estandarizar y validar la técnica de RT-PCR en tiempo real como una herramienta diagnóstica alternativa o confirmatoria para el diagnóstico de la PPC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras de Tejidos

Se colectaron nódulos linfáticos submandibulares y tonsilas de porcinos (n= 36) con signos clínicos compatibles con PPC, provenientes de varias zonas del país y positivos a antígeno del VPPC por IF, y nódulos submandibulares y tonsilas de porcinos (n= 30) sin signos clínicos de PPC, procedente de granjas tecnificadas sin historia de PPC, al menos durante tres años consecutivos, y negativos a antígeno del VPPC por IF.

Para el uso en la prueba de RT-PCR cualitativa en tiempo real, la muestra de cada animal consistió de un machacado de tonsilas

y ganglios submandibulares al 10% (p/v), en medio esencial mínimo (minimum essential medium), con una mezcla de estreptomycin, penicilina y fungizona (Sigma, USA). El sobrenadante del extracto fue alicuotado y congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Aislamiento e Identificación del VPPC por Inmunoperoxidasa**

Las alícuotas (50  $\mu\text{l}$ ) del sobrenadante de cada muestra fueron inoculadas a monocapas de células PK-15 confluentes al 80%, sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  por dos horas para favorecer la adsorción viral. El inóculo se retiró en forma individual de cada pocillo y se reconstituyó con 100  $\mu\text{l}$  de medio con 3% de suero fetal bovino libre de virus endógenos, dejándose en incubación en estufa con  $\text{CO}_2$  por 72 h. Luego las células infectadas fueron congeladas y descongeladas por dos veces para nuevamente servir de inóculo a nuevas monocapas de células PK15. Al final del tercer pasaje, las monocapas fueron procesadas para observar la replicación del VPPC mediante la prueba de inmunoperoxidasa, según el manual del kit Trop-IIP Pestivirus (Australia), que contiene un conjugado específico para detectar la proteína E2 pestiviral. El control positivo fue la cepa del VPPC Alfort/187 con un título de  $\text{DI}_{50}\text{TC}$  de  $10^{-3.5}/50\ \mu\text{l}$  y Brescia con título de  $\text{DI}_{50}\text{TC}$  de  $10^{-2.5}/50\ \mu\text{l}$ , obtenido mediante el método de Reed y Muench (1938).

### **Estandarización de la Técnica de RT-PCR en Tiempo Real**

#### *Cepas de referencia*

Para la estandarización de la técnica de RT-PCR en tiempo real se emplearon cepas de referencia del VPPC: Alfort/187, Brescia y la cepa China vacunal en cultivo celular como controles positivo y las cepas de los virus diarrea viral bovina (VDVB), enfermedad de la frontera (VEF) y una cepa del rotavirus porcino como controles negativos. *Extracción del ARN.*

El ARN de las 66 muestras (extracto de tejido de cada uno de los animales) y de los virus referenciales fue extraído con el kit comercial "SV Total RNA Isolation System" (Promega). Las muestras fueron sometidas a tiocianato de guanidina, buffer de lisis con B-mercaptoetanol y lisis a  $70^{\circ}\text{C}$  por 3 min. El ARN fue precipitado selectivamente con etanol en una membrana de fibra de vidrio en canastas especiales que fueron lavadas y centrifugadas para aclararse del debris celular y proteínas. Se empleó DNasa I para obtener RNA puro que fue diluido en 100  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas y alicuotado en tubos eppendorff libres de nucleasas. El ARN fue almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### *RT-PCR cualitativa Tiempo Real en dos pasos*

La reacción RT-PCR dos pasos se llevó a cabo empleando el kit "DyNAmo SYBR Green 2 step qRT-PCR F430-L" (Finnzymes). La síntesis de ADNc (ADN complementario) fue obtenido utilizando la mezcla 2xRT buffer (200  $\mu\text{M}$  dNTP, 5mM de  $\text{MgCl}_2$  concentración final), M-MuLV RNase H<sup>+</sup>, agua libre de nucleasas y ARN extraído de las cepas virales en el paso anterior (10% del volumen final de reacción). Se emplearon dos protocolos de acuerdo al uso de hexámeros al azar (300 ng/ $\mu\text{l}$ ) o cebadores específicos de la región que codifica la proteína E2 de vPPC (250 nM concentración final) en un volumen final de reacción de 10  $\mu\text{l}$ . Se programó el termociclador PTC 200 Chromo 4 (MJ Research, UK) con el siguiente protocolo:  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 min,  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min,  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 min y  $4^{\circ}\text{C}$  indefinidamente para mantener los productos.

La reacción de PCR en Tiempo real empleó 2x qPCR Master mix (concentración final 1x conteniendo 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , polimerasa Tbr), cebadores de avance (forward) y regreso (reverse) a concentración final de 500 nM, Rox 1x final, agua libre de nucleasas y cDNA obtenido de las cepas virales del primer paso (10% del volumen final) para un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{l}$ .

Cuadro 1. Cebadores utilizados en la estandarización de RT-PCR Tiempo Real para el diagnóstico del virus de la Peste Porcina Clásica

Cebador	Referencia	Longitud (pb) <sup>1</sup>	Secuencia <sup>2</sup>	T° de hibridación <sup>3</sup>
Panpest 5'UTR	Panpestivirus (Letellier <i>et al.</i> , 1999)	298	F:5' AGG GTA GTC GTC AGT GGT TCG3' R:5' TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC 3'	54
E2 PPC	Glicoproteína E2 (Lozada de Gante <i>et al.</i> , 2003)	308	F:5' ATA TAT GCT CAA GGG CGA GT 3' R:5' ACA GCA GTA GTA TCC ATT TC 3'	54
CCH 5'UTR	Cepa china diseñada por programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000)	152	F:5' CGG AGG GAC TAG CCA TAG TG 3' R:5' CCA TCA CGT GGT GTG ATT TC 3'	58.9

<sup>1</sup> Longitud expresada en pares base

<sup>2</sup> Los cebadores se expresan como F (cebador de avance) y R (cebador de regreso)

<sup>3</sup> Las temperaturas de hibridación están expresadas en grados centígrados y fueron calculadas mediante los programas EMBOSS: DAN y TM Calculator de Finnzymes mediante el método del vecino más cercano (Breslauer *et al.*, 1983)

Cuadro 2. Resultado de la prueba de aislamiento-inmunoperoxidasa de las muestras de tejidos positivo (n=36) y negativo (n=30) al virus de peste porcina clásica por inmunofluorescencia

	Aisl -IP (+)	Aisl-IP (-)	Subtotal
Tejidos IF(+)	30 (83.3%)	6 (16.7%)	36
Tejidos IF(-)	1 (3.3%)	29 (96.7%)	30
Subtotal	31	35	66

El programa del termociclador según el set de cebadores empleado fue: 95 °C por 15 min; 40 ciclos de 94 °C por 10 segundos, temperatura en °C (54, 54 o 58.9; Cuadro 1) por 30 segundos según el cebador utilizado, 72 °C por 30 segundos, lectura de placa; extensión final a 72 °C por 10 min, y curva de diso-

ciación desde 55 hasta 95 °C con lectura de placa cada 0.2 °C por 2 segundos y 4 °C indefinidamente. El resultado positivo fue determinado mediante el análisis del valor de las curvas de amplificación (Ct) y disociación (Tm).

Para determinar la cantidad mínima de copias de ARN capaz de detectar la prueba se hizo diluciones en base 10 de la cepa Brescia como referencia para el diagnóstico de la PPC.

En la validación de la técnica de RT-PCR en tiempo real se utilizó las 31 muestras positivas y las 29 negativas al aislamiento-inmunoperoxidasa (Aislamiento-IP) viral empleando el mismo procedimiento de extracción del ARN, síntesis del ADNc y PCR utilizado en la estandarización con las cepas de referencia del VPPC y otras cepas virales como controles negativos.

La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de la prueba

Cuadro 3. Relación de temperaturas de disociación de los productos obtenidos según los cebadores y cepas virales utilizadas

	Panpest 5'UTR	CCH 5'UTR	E2 PPC
Brescia	84.0(+) <sup>2</sup>	-	81.9 (+)
Alfort	84.0 (+)	84.5 (+)	81.5 (+)
Cepa China en Cultivo Celular	84.0 (+)	84.0 (+)	82.5 (+)
Diarrea Viral Bovina (DVB)	84.0 (+)	-	-
Border Disease (BD)	84.0 (+)	-	-
Rotavirus	ad <sup>1</sup> (-)	-	-

<sup>1</sup> ad = ausencia de curva de disociación

<sup>2</sup> En paréntesis se muestra el diagnóstico en concordancia con la temperatura específica para cada producto expresada en grados centígrados

de RT-PCR en tiempo real frente a los resultados de la prueba de aislamiento-*I*<sub>p</sub> fue determinado mediante un cuadro de 2x2 con intervalo de confianza de 95%.

## RESULTADOS

De las 36 muestras positivas al VPPC mediante la prueba de IF, el  $83.3 \pm 12.3\%$  (30/36) fue positivo al aislamiento-*I*<sub>p</sub> y de las 30 muestras negativas por IF, el  $96.7 \pm 3.3\%$  (29/30) resultó negativo (Cuadro 2).

En el Cuadro 3 se observan las temperaturas de disociación (*T*<sub>m</sub>) de los productos de las cepas de referencia del VPPC, panpestivirus (VDVB, VEF) y la cepa de rotavirus porcino como controles negativos en la técnica de RT-PCR empleando los tres pares de cebadores. Asimismo, se indica la amplificación de los productos específicos a determinadas temperaturas de disociación.

El par de cebadores de Panpest 5'UTR generó productos específicos con las cepas de referencia del VPPC y la cepa del VDVB

y VEF con una *T*<sub>m</sub> de 84 °C, pero no generó producto con el rotavirus porcino indicando la especificidad de los cebadores (Fig. 1). El par de cebadores de CCH 5'UTR generó productos específicos con las cepas de referencia del VPPC Alfort/187 y la cepa china en cultivo celular con una *T*<sub>m</sub> de 84.4 y 84.0 °C, respectivamente, pero hubo ausencia de productos específicos con la cepa Brescia y los VDVB y VEF (Fig. 2). A diferencia, el par de cebadores E2 del VPPC generó productos específicos con las cepas del VPPC Brescia con una *T*<sub>m</sub> de 81.8 °C, Alfort/187 con 81.4 °C y cepa china vacunal con 82.4 °C (Fig. 3). El cebador E2 del VPPC no generó productos con los controles negativos, por lo que se optó por emplear el juego de cebadores E2 del VPPC para la validación con las muestras de campo, pues la disminución del fondo o ruido permite un mejor análisis de la curva de *T*<sub>m</sub> (Bustin *et al.*, 2005). La prueba de RT-PCR fue capaz de detectar al menos 4.28 pg del ARN viral con un Ct de 29.7, indicando la alta sensibilidad diagnóstica de la prueba (Fig. 4).

El  $96.8 \pm 6.0\%$  (30/31) de las muestras positivas a la prueba de aislamiento-*I*<sub>p</sub> resul-

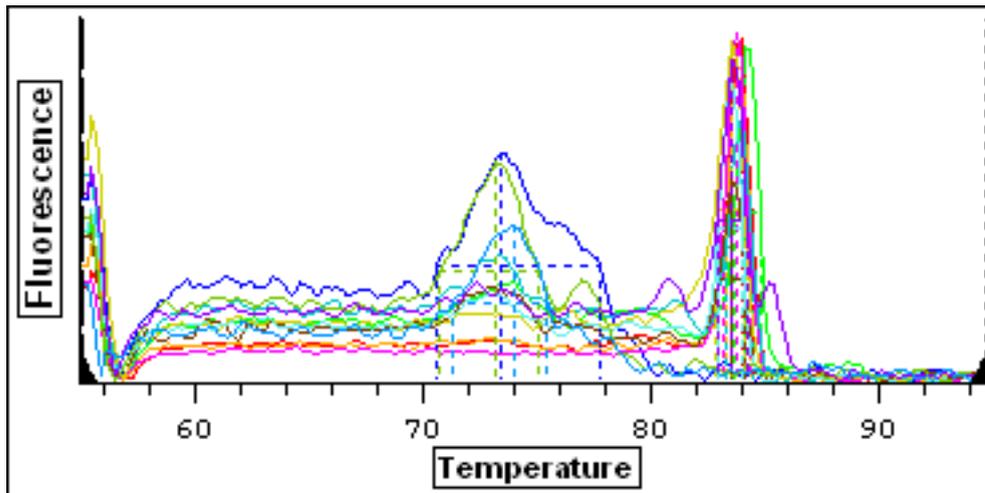


Figura 1. Resultados de las curvas de Tm de las cepas de virus controles positivos y negativos utilizando cebadores Panpest 5'UTR. Rojo = Brescia; verde = Alfort; azul = cepa china vacunal; naranja = DVB; violeta = BD; marrón = Rotavirus; celeste = agua libre de nucleasas

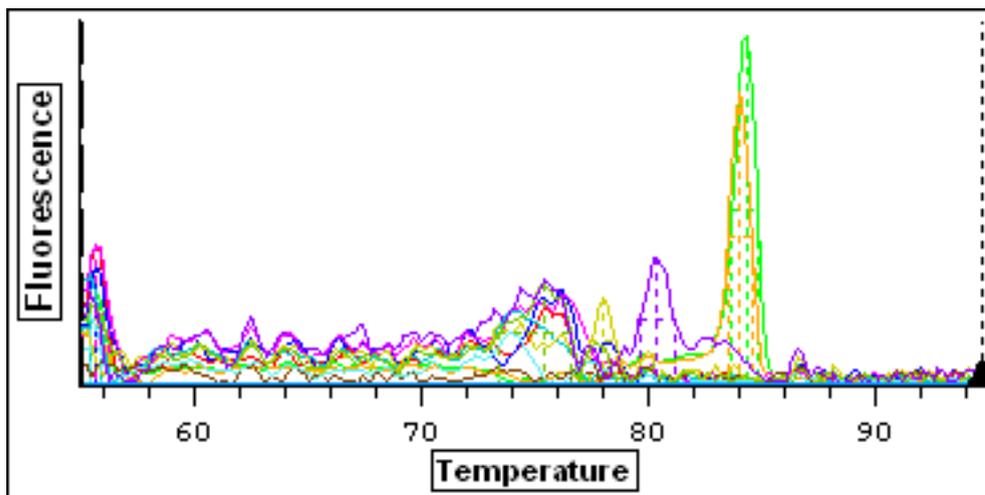


Figura 2. Análisis de la curva de Tm de los controles positivos y negativos utilizando cebadores 5'UTR CCH. Rojo = Brescia; verde claro = Alfort; naranja = cepa china en cultivo celular; morado = DVB; marrón = BD; azul = Rotavirus; Celeste = agua libre de nucleasas

tó positivo al VPPC mediante RT-PCR en tiempo real y el  $82.9 \pm 12\%$  (29/35) de las muestras negativas a la prueba de aislamiento-IP resultó negativo al VPPC mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores predictivos

positivo negativo de la prueba de RT-PCR en tiempo real para la detección del ARN del virus de la PPC fueron de  $83.3 \pm 12.3\%$  y  $96.7 \pm 3.3\%$ , respectivamente.

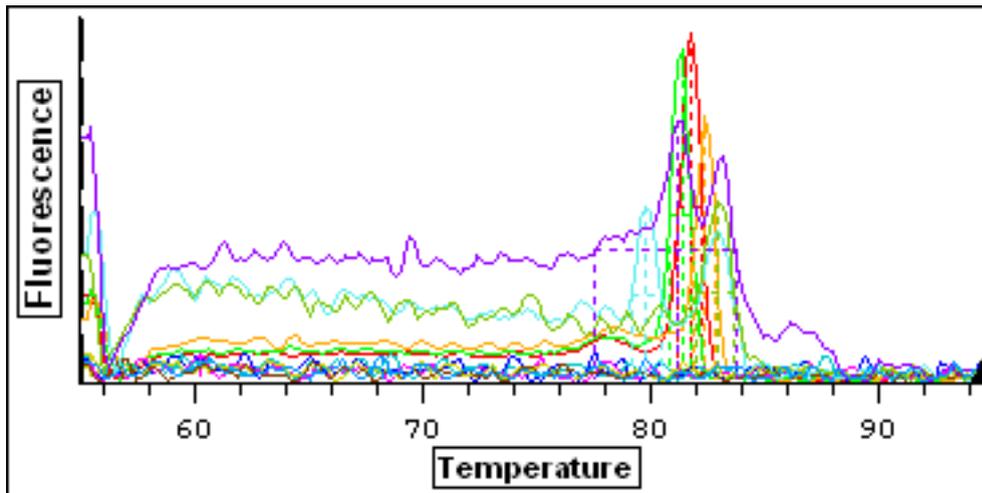


Figura 3. Análisis de curva de disociación de controles positivos y negativos utilizando cebadores E2 del VPPC. Rojo = Brescia; verde = Alfort/187; azul = cepa china vacunal; morado = VDVb; violeta = VEF; marrón = Rotavirus; celeste = agua libre de nucleasas

## DISCUSIÓN

La técnica de aislamiento viral (aislamiento-*I<sub>p</sub>*) es la prueba estándar de oro para el diagnóstico de la PPC y como tal, sirve para la validación de otras técnicas diagnósticas, incluso las moleculares (Wirz *et al.*, 1993). En el presente estudio, el aislamiento viral mostró una sensibilidad de 83.3% (30/36) y una especificidad de 96.7% (29/30). Esta prueba posee una alta especificidad, pero la sensibilidad puede ser afectada por factores como la presencia de anticuerpos en la muestra, susceptibilidad de la células, dosis y viabilidad de virus en la muestra, etc. (Risatti *et al.*, 2005; OIE, 2007).

La técnica de RT-PCR en tiempo real fue estandarizada utilizando tres pares de cebadores: el cebador Panpest 5'UTR generó productos con todas las cepas del género pestivirus (VPPC, VDVb y VEF), el cebador CCH 5'UTR generó productos con la cepa china homóloga pero no reconoció a la cepa Brescia, y el cebador E2 del VPPC generó productos únicamente con las cepas del

VPPC, por lo que este cebador fue utilizado en la validación de la RT-PCR en tiempo real con las muestras positivas y negativas de campo (Cuadro 3, Fig. 3).

Las cepas de referencia del VPPC y la cepa china vacunal mostraron una *T<sub>m</sub>* de 81.5 a 84.0 °C (Cuadro 3, Fig. 1, 2 y 3). La *T<sub>m</sub>* es llevada a cabo en una plataforma para el PCR en tiempo real y significa que los productos específicos se disocian a una temperatura más alta que los productos no específicos. La *T<sub>m</sub>* es análoga al de la electroforesis en gel de agarosa porque evidencian productos específicos y no específicos (Giglio *et al.*, 2003).

La sensibilidad de la prueba RT-PCR en tiempo real, empleando el cebador E2 PPC, fue de  $96.8 \pm 6.0\%$  (30/31), similar a otros reportes obtenidos con la variante RT-PCR tipo anidada y empleando la sonda TaqMan para amplificar la región *N<sub>pro</sub>* del genoma viral (Dewulf *et al.*, 2004; Risatti *et al.*, 2005). La similitud en los resultados de sensibilidad implica un excelente desempeño del cebador E2 del VPPC y del fluoróforo SYBR Green II.

La ventaja del SYBR Green II es su bajo costo, fácil manejo y alta sensibilidad; sin embargo, al unirse a todos los ADN presentes en la reacción, incluyendo los dímeros de los cebadores, no es posible cuantificar la cantidad del producto amplificado, por tanto los resultados son solo de tipo cualitativo. A diferencia, las sondas TaqMan y Beacon, entre otras, son específicas a una secuencia complementaria del ADN, permitiendo cuantificar el producto amplificado, pero son muy costosas (Hoffmann *et al.*, 2005). El propósito del presente estudio fue disponer de una técnica rápida y específica para un rápido diagnóstico de la PPC, importante para esta primera etapa de control de la PPC en el país.

La prueba de RT-PCR en tiempo real utilizando la cepa Brescia del VPPC mostró una capacidad de detectar al menos 4.28 pg de ARN viral con un valor de la curva de amplificación (Ct) de 29.7 (Fig. 4). El resultado es similar a lo reportado por Risatti *et al.* (2005), aunque en ese caso se utilizó la sonda TaqMan, que confiere una alta sensibilidad a la prueba. La alta sensibilidad de la prueba RT-PCR en tiempo real validada en el presente estudio frente a la prueba estándar de oro puede explicarse por la capacidad de la técnica de RT-PCR de detectar pequeñas cantidades de ácidos nucleicos, sean estas moléculas viables o no (McGoldrick *et al.*, 1999). Estas cualidades permiten que la prueba de RT-PCR en tiempo real sea de gran utilidad para el diagnóstico de enfermedades como la PPC que requieren un eficiente y rápido diagnóstico y en tiempo real (Belák, 2007; OIE, 2007).

Del total de muestras negativas al aislamiento-Ip, el  $83.0 \pm 12\%$  (29/35) resultó negativo al VPPC mediante RT-PCR en tiempo real, indicando que la prueba posee una alta especificidad diagnóstica (Cuadro 3). La muestra interpretada como positiva al aislamiento-Ip resultó negativa a VPPC por RT-PCR. La positividad de la muestra al aislamiento podría deberse a un error en la lectura de la prueba de inmunoperoxidasa o podría haber sido otro pestivirus por lo que no habría sido detectado por el cebador E2.

Los valores predictivos negativo ( $96.7 \pm 3.3\%$ ) y positivo ( $83.3 \pm 12.3\%$ ) para la prueba estandarizada y validada fueron similares al encontrado en la prueba validada por Risatti *et al.* (2005). El valor predictivo negativo implica la ausencia o escasez de falsos negativos para muestras de campo y el valor predictivo positivo implica la probabilidad de padecer PPC al existir un resultado positivo a la prueba (Pita Fernández y López de Ullibarri, 1999).

La implementación de una prueba basada en la tecnología de la genética molecular para detectar al VPPC, y su uso conjuntamente con las técnicas convencionales será de gran importancia para el control de la PPC en el país. Se ha demostrado también que mediante la técnica de RT-PCR puede detectarse el ARN del VPPC en tejidos fijados en formalina (Ha *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2005), lo que podría ser muy ventajoso ante la sospecha de la ocurrencia de PPC en porcinos de lugares alejados en la sierra y selva del país, o ante la imposibilidad de enviar tejidos frescos al laboratorio, pues las pruebas convencionales de IF o aislamiento viral requieren de tejidos frescos y adecuadamente conservados.

## CONCLUSIONES

- ? La prueba RT-PCR en tiempo real fue estandarizada utilizando tres pares de cebadores; de los cuales, el par de cebadores E2 del VPPC dio el mejor resultado al detectar al 100% de los controles positivos constituidos por las cepas de referencia del VPPC, y negativos constituidos por cepas del VDVB y VEF del mismo género pestivirus, y una cepa de rotavirus porcino.
- ? La prueba es capaz de detectar al menos 4.28 pg de ARN viral.
- ? La prueba RT-PCR en tiempo real validada con el par de cebadores E2 del VPPC posee una sensibilidad de  $96.8 \pm 6.3\%$  y una especificidad de  $83.0 \pm 12\%$ , así como valores predictivos positivo y

negativo de  $83.3 \pm 12.3\%$  y  $96.7 \pm 3.3\%$ , respectivamente.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Mariluz Araínga quién contribuyó en la gestión para obtener las cepas de referencia de la PPC Alfort /187 y Brescia. El estudio fue financiado por el Consejo Superior de Investigaciones de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### LITERATURA CITADA

1. **Agüero M, Fernández J, Romero L, Zamora M, Sánchez C, Belák S, Arias M, Vizcaíno JM. 2004.** A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. *Vet Res* 35: 551-563.
2. **Belák S. 2007.** Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects. A view from the OIE collaborating Centre for application of polymerase chain reaction methods for diagnosis of viral diseases in veterinary medicine. *Vaccine* 25: 5444-5452.
3. **Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA. 1983.** Predicting DNA Duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3746-3750.
4. **Bustin, SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. 2005.** Quantitative Real Time RT-PCR, a perspective. *J Mol Endocrinol* 34: 597-601.
5. **Dewulf J, Koenen F, Mintiens K, Denis P, Ribbens S, de Kruif A. 2004.** Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection. *J Virol Methods* 119: 137-143.
6. **Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, et al. 2006.** Real Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 19: 165-256.
7. **Giglio S, Monis PT, Saint CP. 2003.** Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res* 31(22): e136.
8. **Ha S-K, Chi C, Chae C. 2004.** Development of an optimized protocol for the detection of classical swine fever virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by seminested reverse transcription-polymerase chain reaction and comparison with in situ hybridization. *Res Vet Sci* 77: 163-169.
9. **Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirrmeier H, Depner K. 2005.** Validation of a real time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods* 130: 36-44.
10. **Le Dimna M, Vrancken R, Koenen F, Bougeard S, Mesplede A, Hutet E, Kuntz-Simon G, Le Potier MF. 2008.** Validation of two commercial real time RT-PCR kits for rapid and specific diagnosis of classical swine fever virus. *J Virol Methods* 147: 136-142.
11. **Letellier C, Kerkhofs P, Wellermans G, Vanopdenbosch A. 1999.** Detection and genotyping of Bovine Diarrhea Virus by RT-PCR amplification of the 5' untranslated region. *Vet Microbiol* 64: 155-167.
12. **Lin M, Trottier E, Mallory M. 2005.** Enzyme-linked immunosorbent assay based on a chimeric antigen bearing antigenic regions of structural proteins Erns and E2 for serodiagnosis of classical swine fever virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 877-881.
13. **Lorena J, Barlic-Maganja D, Lojkić M, Madic J, Grom J, Cac Z, Roic B, Terzić S, et al. 2001.** Classical swine fever virus (C strain) distribution in organ samples of inoculated piglets. *Vet Microbiol* 81: 1-8.
14. **Lozada de Gante A, Estrada E, Diosdado F, Escabel G, Carrera E, González-Vega D, García H, Morilla**

- A. 2003. Estudio epidemiológico de la fiebre porcina clásica en granjas del altiplano de México. *Tec Pec*, Méx 41: 261-274.
15. **McGoldrick A, Bensaude E, Ibata G, Sharp G, Paton DJ. 1999.** Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J Virol Methods* 79: 85-95.
  16. **Mendoza SE, Coba-Ayala MA, Correa-Girón P, Ciprián-Carrasco A. 2005.** Enfermedades de importancia económica en producción animal. En: *Enfermedades de importancia económica en los animales domésticos*. México: McGraw-Hill. p 43-65.
  17. **Moennig V, Floegel-Niesmann G, Greiser-Wilke I. 2003.** Clinical signs and epidemiology of Classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet J* 165: 11-20.
  18. **Moser C, Stettler P, Tratschin JD, Hofmann MA. 1999.** Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of Classical swine fever virus. *J Virol* 73: 7787-7794.
  19. **OIE. 2007.** Terrestrial animal health code (2007). OIE International [Internet], [16 enero 2008]. Disponible en: [http://www.oie.int/eng/normes/Mcode/en\\_chapitre\\_2.6.7.htm](http://www.oie.int/eng/normes/Mcode/en_chapitre_2.6.7.htm)
  20. **Paton DJ, Greiser-Wilke I. 2003.** Classical swine fever - an update. *Res Vet Sci* 75: 169-178.
  21. **Pita Fernández S, López de Ullibarri I. 1999.** Medidas de concordancia: el índice Kappa. *Cad Aten Primaria* 6: 169-171.
  22. **Reed LJ, Muench H. 1938.** A simple method for estimating fifty percent end points. *Am J Hyg* 27: 493-496.
  23. **Risatti G, Holinka L, Lu Z, Cutis G, Callahan JD, Nelson WM, Brea Tió E, Borca MV. 2005.** Diagnostic evaluation of a Real Time Reverse Transcriptase PCR assay for detection of classical swine fever virus. *J Clin Microbiol* 43: 468-471.
  24. **Rozen S, Skaletsky H. 2000.** Primers on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds). *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa, NJ: Humana Press. p 365-386.
  25. **Singh VK, Kumar GS, Paliwal OP. 2005.** Detection of classical swine fever virus in archival formalin-fixed tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 79: 81-84.
  26. **Van Oirschot JT. 2003.** Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol* 96: 367-384.
  27. **Wirz B, Tratschin JD, Muller HK, Mitchell DB. 1993.** Detection of hog cholera virus and differentiation from other Pestiviruses by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 31: 1148-1154.