

EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA DE RT-PCR ESPECÍFICA PARA LA DETECCIÓN DEL SEROTIPO 8 DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL EN CABRAS

EVALUATION OF AN RT-PCR-BASED TECHNIQUE FOR THE DETECTION OF BLUETONGUE SEROTYPE 8 IN GOATS

M García Revilla, G Hervás Bedmar, AE Spitzer

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

Resumen

El virus de la lengua azul (vLA) es un *Orbivirus* transmitido por mosquitos hematófagos del género *Culicoides*. En el norte de España ha aparecido recientemente el serotipo 8, afectando a ovejas y vacas. Los serotipos de vLA son tan distintos entre sí, que las vacunas no ofrecen protección cruzada. Por tanto, es fundamental identificar cual afecta al animal para aplicar la vacuna correcta. En estudios recientes se ha desarrollado un ensayo de RT-PCR para detectar el serotipo 8 de vLA en vacas y ovejas. En este estudio hemos evaluado dicha técnica para la detección específica del serotipo 8 en cabras. Se analizaron 15 sueros de cabras infectadas y sobrenadantes de cultivos celulares infectados con el serotipo 8. Las muestras de sueros analizados no dieron resultados positivos.

Palabras clave: lengua azul, serotipo 8, RT-PCR, cabras.

Summary

Bluetongue virus (BTV) is an *Orbivirus* transmitted by haematophagous insects of the genus *Culicoides*. In the north of the Iberian Peninsula, BTV-8 has appeared recently, affecting sheep and cattle. Bluetongue serotypes are so different among them, that vaccines do not offer cross-protection. Thus, it is important to detect which serotype is affecting an animal, in order to apply the correct vaccine. An RT-PCR assay has been developed recently to detect BTV-8 in cattle and sheep. In this study we have evaluated this RT-PCR technique as a diagnostic tool for the specific detection of BTV-8 in goats. Sera samples from 15 infected goats and supernatants from BTV-8 infected cell cultures were analyzed. No positive results were obtained for the analyzed samples.

Key words: Bluetongue, serotype 8, RT-PCR, goats.

Introducción

La lengua azul (LA) es una enfermedad provocada por un virus de la familia *Reoviridae*, del género *Orbivirus*, del cual se conocen hasta el momento 24 serotipos (Roy, 1996). En España, últimamente los serotipos encontrados han sido el 1, 2, 4 y 8, habiéndose confirmado la presencia de este último muy recientemente en Cantabria, concretamente el 17/01/2008. En este último, el serotipo 8, hemos centrado nuestro estudio, debido a su reciente aparición en nuestro país.

Los *Orbivirus* son transmitido por vectores, concretamente por un mosquito hematófago del género *Culicoides* (du Toit, 1944). Estos mosquitos, de 1 a 3 mm de longitud, no nacen infectados, si no que cuando pican y toman la sangre del animal infectado quedan portadores del virus, pudiendo así transmitir la enfermedad por picadura a otros animales.

Aunque actualmente el virus se puede encontrar por países de temperaturas frías como los del norte de Europa, EEUU, Australia, etc., apareció por primera vez en países tropicales (Mellor y Boorman, 1995). El aumento en la distribución del microorganismo por el mundo se puede deber a dos razones, el calentamiento global – el aumento de las temperaturas ayuda a que los mosquitos transmisores del virus puedan vivir en lugares donde antes no lo hacían- y la globalización.

En España se han detectado los serotipos 1 y 8 conjuntamente en una franja que va desde Asturias hasta el Cataluña, mientras que en La Rioja se ha confirmado la presencia únicamente del serotipo 1. Por último, toda la parte del centro, sur y oeste de la península está ocupada por los serotipos 1 y 4

(http://rasve.mapa.es/Publica/Focos/Focos_ResultadoBusqueda.asp).

El objetivo de este estudio es comprobar si la técnica de RT-PCR convencional (Mertens y cols. 2007), utilizada para la detección del vLA-8 en ganado vacuno y ovino, es efectiva también para la detección de este serotipo en cabras, dada la importancia económica que esta especie tiene en nuestro país.

Material y Métodos

Para el estudio de la técnica de RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), se utilizaron 15 sueros provenientes de cabras del País Vasco. Estas cabras, eran sospechosas de ser portadoras de la vLA-8 (serotipo 8 del virus de la Lengua Azul), debido a que 11 de ellas, resultaron positivas a anticuerpos mediante una técnica ELISA genérico y las 4 restantes a una PCR genérica. Como control positivo se utilizó el sobrenadante de células infectadas *in vitro* con el vLA-8 y como control positivo se utilizó agua. El hecho de que las técnicas que se utilizaron son genéricas, nos indican que son portadoras del virus de la lengua azul, pero no sabemos a qué serotipo nos estamos enfrentando.

Para ello, realizamos una técnica de RT-PCR convencional descrita por **Mertens y cols. (2007)**, seguida de una electroforesis en gel de agarosa para visualizar los resultados obtenidos.

Para realizar la técnica, preparamos una mezcla que denominaremos MIX, en la que introduciremos las enzimas Taq polimerasa y retrotranscriptasa, primers (Primer forward: *GATAGAATRCGTTCCCGCCT*, Primer reverse: *GTAGGACGAGCCAGGATTGACGCG*) y nucleótidos libres (añadidos por la polimerasa tras unirse el primer a la secuencia específica de DNA)

Tras la preparación del MIX, proseguimos con la amplificación de DNA con el termociclador, que realizará 40 ciclos para amplificar el DNA. Cada ciclo se divide en varias fases: En la primera fase del ciclo, la temperatura se aumenta hasta los 95°C, para que las hebras de DNA se separen. Acto seguido, la temperatura disminuye a 65°C, para que los primers busquen sus secuencias complementarias en las hebras de DNA. En el siguiente paso, la temperatura aumenta a los 72°C, temperatura óptima para que la enzima *taq polimerasa* actúe al máximo rendimiento.

Tras la RT-PCR, se realiza la visualización de las 15 muestras, mediante la técnica de la electroforesis en gel de agarosa, teñidos con el colorante SYBR-GREEN. Esta tinción nos permite visualizar los productos de RT-PCR compuestos de DNA bicatenario.

En cada gel, se incluye un marcador de peso molecular, que permite poder compararlo con el tamaño del producto de PCR del virus. En nuestro caso, el control positivo dio una banda de peso molecular de 562 pares de bases.

Tras la electroforesis, los geles se visualizaron mediante una cámara de documentación de geles con luz azul (**Figura 1**)

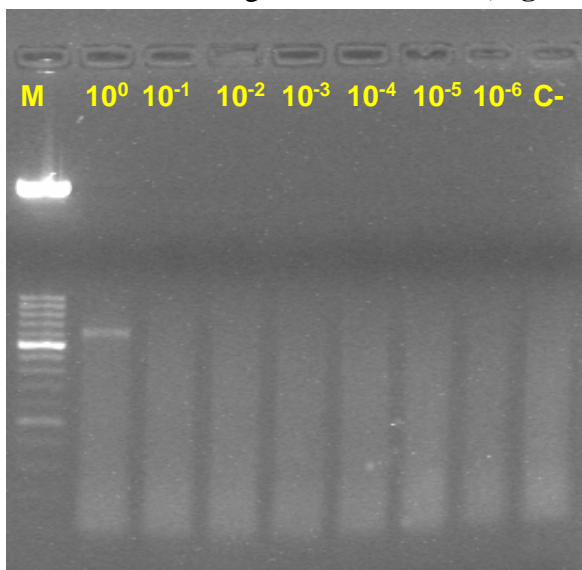


Figura 1. Ensayo de sensibilidad de la técnica. Se utilizó un control positivo (10^0) y se realizaron diluciones seriadas en base 10. En la figura se muestra el gel de agarosa en el que se cargaron los productos de PCR obtenidos. Se puede comprobar que sólo el control positivo sin diluir (10^0) se pudo detectar con la técnica utilizada en este estudio.

Resultados

Hemos querido aplicar por primera vez una RT-PCR convencional para detectar el vLA-8 en cabras infectadas, provenientes del País Vasco. La técnica utilizada ya había sido descrita por **Mertens y cols.** (2007) para vacas y ovejas. De las 15 muestras analizadas, todas dieron resultados negativos, ya que ninguna de ellas poseía la banda de 562 pares de bases del producto de RT-PCR (**Figura 1**). Sin embargo, la técnica funciona adecuadamente porque observamos el resultado esperado en sobrenadantes de cultivos infectados con vLA-8, que hemos utilizado como control positivo (**Figura 2**). La detección de vLA-8 se detecta únicamente cuando el sobrenadante se utiliza sin diluir y su concentración es aproximadamente 1.5×10^4 TCID/ml. Diluciones menores a ésta no son detectadas en con la técnica evaluada.

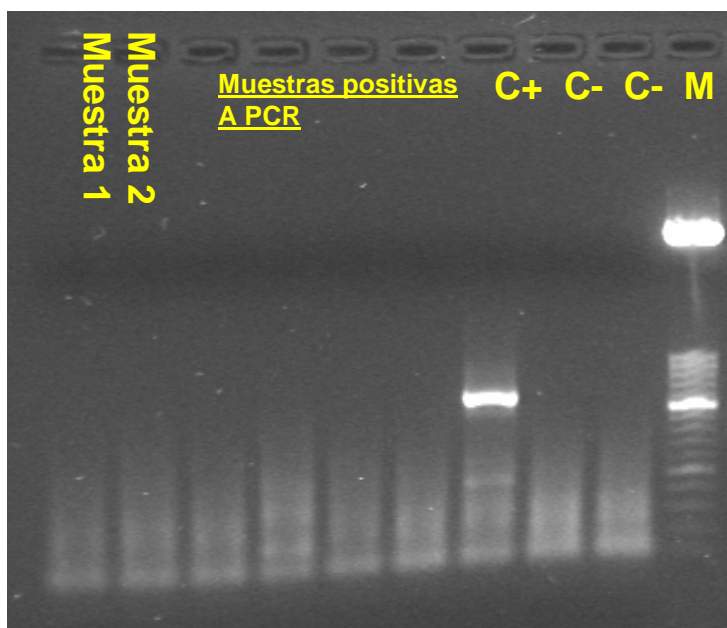


Figura 2. Gel de agarosa con los resultados de las muestras analizadas. En los seis primeros carriles de la derecha se muestran los resultados de las cabras analizadas. El carril siete muestra el producto de PCR obtenido a partir de un control positivo. La banda obtenida, de 562 pares de bases, es la esperada. Los carriles ocho y nueve se corresponden a dos controles negativos y el carril diez es el marcador de peso molecular.

Discusión

La técnica de RT-PCR aplicada en este estudio ya había sido previamente validada para muestras de vacas y ovejas. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que 1) en el caso de muestras de cabras esta técnica no parece ser lo suficientemente sensible o 2) que el serotipo presente en las muestras no es el 8, sino el 1, como parecen indicar otros estudios realizados con las mismas muestras (no se muestran los datos). El artículo utilizado como referencia para realizar este ensayo describe los cebadores que se han utilizado en este estudio y los resultados positivos obtenidos con muestras de vaca y oveja. Sin embargo, no se dan datos de sensibilidad que puedan compararse con los obtenidos con nuestras muestras.

Conclusiones

La técnica utilizada en este estudio no ha podido ser evaluada, debido probablemente a que las muestras analizadas resultaron pertenecer a otro serotipo de lengua azul que no es el que detecta el ensayo de PCR evaluado. Por tanto, los autores se han replanteado el estudio y se disponen a estandarizar esta técnica de detección de vLA-8 utilizando PCR a tiempo real, que aporta una sensibilidad mayor, y controles positivos de vLA. Una vez que la técnica esté puesta a punto, se reevaluarán las muestras procedentes de cabras que se han analizado en este estudio. La mayor dificultad que se encuentran los autores es la falta de datos bibliográficos en los que se describa la sensibilidad de esta técnica.

Agradecimientos

Los autores quieren expresar su agradecimiento al Prof. José Manuel Sánchez-Vizcaíno y a la Dra. Belén Rodríguez Sánchez, ambos pertenecientes al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM, por su ayuda en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Bibliografía

Du Toit, RM. (1944) The transmission of bluetongue and horse-sickness by Culicoides. Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind. 19, 7-16.

Mellor PS, Boorman J. (1995) The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. Ann Trop Med Parasitol. 89:1-15.

Mertens PP, Maan NS, Prasad G, Samuel AR, Shaw AE, Potgieter AC, Anthony SJ, Maan S. (2007) Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains. J. Gen. Virol., 88:2811-2823.

Roy P. (1996) Orbivirus structure and assembly. Virology 216: 1-11. Erratum in: Virology 1996, 218:296.