

APLICACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DENTRO DEL PROGRAMA DE ERRADICACIÓN DE FIEBRE AFTOSA EN ECUADOR

Garrido, Ana^{a*}; Barrera, Maritza^b; Vaca, María^a; Jarrín, David^a; Pachacama, Silvia^a;
De La Torre, Euclides^a; Sandoval, Patricio^a

^aAgencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro – AGROCALIDAD, Av. Interoceánica Km. 141/2, La Granja
MAGAP, Quito, Ecuador.

^bSecretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación-SENESCYT, Casa Patrimonial, calle 9 de
Octubre y Ramírez Dávalos, Quito, Ecuador

Ingresado: 30/04/2015

Aceptado: 28/09/2015

Resumen

La Fiebre Aftosa (FA) es altamente contagiosa y ha provocado considerables pérdidas en la historia de la producción pecuaria mundial. La técnica PCR ha sido implementada en el Laboratorio como una herramienta importante en el proceso de monitoreo, dentro del Programa de Erradicación de Fiebre Aftosa llevado a cabo por AGROCALIDAD. Se presentan los resultados del estudio de la sensibilidad y repetibilidad de una metodología de PCR utilizando distintos juegos de cebadores para la identificación de la presencia del virus y del Serotipo O obteniendo como resultado una alta sensibilidad de 1pg y 100% de repetibilidad para los 2 juegos de cebadores. Se aplicó la metodología estandarizada en el monitoreo de 44 muestras de epitelio bovino de distintas provincias del país y lavados esófago-faríngeos negativos por aislamiento viral, todas las muestras resultaron negativas. Estas muestras procedían de diferentes provincias del país, dentro de las actividades de vigilancia epidemiológica que mantiene el Proyecto Nacional de Erradicación de la Fiebre Aftosa.

Palabras clave: ARN, Ecuador, Fiebre Aftosa, RT-PCR.

APPLICATION OF DIAGNOSIS BY POLYMERASE CHAIN REACTION WITHIN THE PROGRAM OF ERADICATION OF FOOT AND MOUTH DISEASE IN ECUADOR

Abstract

Foot and Mouth Disease (FMD) is a highly contagious disease, historically it had caused considerable losses in global livestock production. The PCR technique has been applied in the Laboratory as an important tool in the monitoring process within the program to eradicate FMD conducted by AGROCALIDAD. The sensitivity and reproducibility was assessed for different sets of primers for the identification of infected animals and O serotype. Obtaining a high sensitivity of 1 pg and a 100% of reproducibility for both primer sets. The standardized methodology was applied for screening FMDV RNA in 44 samples of bovine epithelium of different provinces and oesophageal-pharyngeal fluids negative of virus isolation, all sample samples with negative results. These samples came from different provinces within the surveillance activities supported by the National Project for Eradication of FMD.

Keywords: ARN, Ecuador, Foot and Mouth Disease, RT-PCR.

* Correspondencia a: Ana Garrido, Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro – Agrocalidad Dirección: Av. Interoceánica Km. 141/2, La Granja MAGAP, Tumbaco, Ecuador. Teléfono: (593) 02 2372 844. e-mail: ana.garrido@agrocalidad.gob.ec

I. INTRODUCCIÓN

El virus de la Fiebre Aftosa (FA) es un miembro del género *Aphthovirus* de la familia *Picornaviridae*. La partícula viral no tiene envoltura y tiene un tamaño de aproximadamente 30 nm de diámetro. El genoma está compuesto de una molécula de ARN de cadena simple y polaridad positiva. Existen siete serotipos inmunológicamente diferentes del virus: tipos O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 y Asia 1 [1]. La Fiebre Aftosa es una enfermedad de los animales de pezuña hendida incluyendo el ganado vacuno, cerdos, ovejas y cabras, en los cuales se producen vesículas en la lengua, las encías, el hocico y las patas [2]. Aunque la Fiebre Aftosa raramente causa la muerte en los adultos, puede matar a los animales jóvenes y como resultado de la infección se producen grandes pérdidas en la producción de leche y carne. Esta enfermedad es muy contagiosa y el virus tiene la capacidad de diseminarse rápidamente. Como consecuencia, es considerada la enfermedad de mayor impacto económico en la producción ganadera [3].

La enfermedad fue reportada en el cono sur (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay) por primera vez en 1870, posteriormente se diseminó rápidamente por otros países sudamericanos hasta que en la década del 50 se reportó en Venezuela y Colombia y más tarde en Ecuador, la fecha exacta del primer reporte en Ecuador no está clara ya que Palacios [4] refiere que la Fiebre Aftosa, tipo A, se diagnosticó por primera vez en el Ecuador en 1956 y Malirat et al [5] refieren que se reportó en 1961, y en esta fecha se declaró como enfermedad endémica para el continente. En el año 2002 la infraestructura inadecuada de las instituciones gubernamentales de Salud Animal y el movimiento de ganado a través de un mercado informal hicieron que en el 2002, la Fiebre Aftosa no pudiera ser erradicada de Ecuador y se produjera una epidemia de escala sin precedentes [6]. Los virus FA causales de estos brotes pertenecían al serotipo O que se diseminaron a través de quince provincias de Ecuador [6, 3]. La Ley de Erradicación de la Fiebre Aftosa de 16 de abril de 2004 [7] declara en su artículo 1 que esta enfermedad es de interés nacional y de carácter obligatorio la lucha por su erradicación del Territorio Nacional. El Proyecto Nacional de Erradicación de la Fiebre Aftosa en el Ecuador se declaró prioritario por la Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES) en 2011 mediante Oficio SENPLADES-SIPdap-2011-334 [8]. Seguidamente en el oficio 050 de AGROCALIDAD se establecen las fechas de la primera fase de vacunación contra la Fiebre Aftosa en todo el territorio nacional, con excepción de la provincia Insular de Galápagos [9] lo que ha continuado hasta el presente: las acciones del proyecto de erradicación dando lugar a que no se hayan

reportado casos desde agosto de 2011, fecha en que se produjo el último brote en la provincia de El Oro. [10].

El aislamiento del virus de la Fiebre Aftosa, aunque es el método más sensible, ya que se considera como prueba de oro para el diagnóstico de este virus, se demora al menos 4 días para poder informar como negativa una muestra [11,12] y está afectado por la conservación de la viabilidad del virus durante el traslado de la muestra al laboratorio. La reacción en cadena de la polimerasa con retro-transcripción (RT-PCR) es un método rápido que pone en evidencia la presencia de ARNs virales en muestras de tejidos con una alta sensibilidad y especificidad y no se requiere que el virus se encuentre viable, representando una ventaja para la bioseguridad [13]. La RT-PCR se ha aplicado para el diagnóstico de una gran cantidad de virus animales [14] y en el caso de FA su utilización está aceptada por la organización de la salud animal OIE [1]. Un diagnóstico rápido y exacto es esencial para el mantenimiento del programa de erradicación y para la confirmación del estatus de libre de infección [13]. La Fijación de Complemento fue la técnica más utilizada para el diagnóstico de Fiebre Aftosa, pero debido a su falta de sensibilidad y la presencia de factores pro y anti complementarios, ha sido sustituida en la mayoría de los laboratorios por el ELISA de captura de antígeno, el cual es rápido, pero carece de la sensibilidad requerida para detectar los antígenos virales en algunas muestras [11]. Para la detección de anticuerpos a las proteínas no capsidales o no estructurales del virus se recomienda el ELISA 3 ABC y el EITB (enzyme linked immunotransfer blot) [1], estas pruebas son útiles proporcionando evidencia de replicación viral previa o actual en el huésped, con independencia de si el animal es vacunado o no. La RT-PCR ha probado ser un método rápido específico y confiable para el diagnóstico del virus FA en muestras de epitelio vesicular [15, 16]. El Centro Panamericano de Fiebre Aftosa ha desarrollado una metodología de RT-PCR en gel para el diagnóstico de este virus que puede ser utilizada para detectar cualquier serotipo de Fiebre Aftosa y posteriormente identificar los serotipos O, A y C que son los que hasta el presente han producido brotes de Fiebre Aftosa en Sudamérica [17]. Además la OIE [1] recomienda un protocolo de RT-PCR en tiempo real [18] para el diagnóstico de todos los serotipos, que tiene la ventaja de obtener los resultados más rápidamente que el PCR en gel, lo que es de gran importancia para esta enfermedad.

Se considera portador a un animal cuando el virus persiste en el fluido faríngeo por más de 28 días a partir de la infección subclínica o no, en rumiantes vacunados y no vacunados expuestos al virus vivo [1]. La RT-PCR puede ser aplicada para la detección de ARN del virus FA en muestras de fluido faríngeo para demostrar la presencia de portadores dado que este es el sitio

Tabla I. Muestras de diferentes provincias de Ecuador recibidas para diagnóstico de fiebre aftosa en epitelios, negativas por RT-PCR en gel y el resultado del diagnóstico serológico por ELISA 3abc o EITB

2012				2013				2014			
Provincia	Caso No.	ELIS A	EIT B	Provincia	Caso No.	ELIS A	EIT B	Provincia	Caso No.	ELIS A	EIT B
Loja	162-1	NS	NS	El Oro	09	-	NA	Tsáchilas	02	-	NA
	162-2	NS	NS	Esmeraldas	396	-	NA				
	162-3	NS	NS		016	NA	-				
	162-4	NS	NS	Loja	397-1	-	NA				
Napo	164	±	-		327-2	-	NA				
	165-1	-	NA	Morona Santiago	246	-	NA				
	165-2	-	NA		248-1	-	NA				
	166	-	NA		248-2	-	NA				
Orellana	168-1	±	-		248-3	-	NA				
	168-2	-	NA	Napo	804	-	NA				
	188	-	NA	Orellana	02-1	-	NA				
Pastaza	37	-	NA		02-2	-	NA				
	187	NS	NS		04-1	-	NA				
Pichincha	123-1	-	NA		04-2	-	NA				
	123-2	-	NA		05-1	-	NA				
	123-3	-	NS		05-2	-	NA				
Sucumbíos	155	-	NA	Pastaza	03	-	NA				
	177	-	NA		011	-	NA				
	163	-	NA		30	NS	NA				
				Tsáchilas	022	-	NA				
					308-1	-	NA				
					308-2	-	NA				
					013	-	NA				
				Tungurahua	021	NA	-				
Total	19			Total	24			Total	1		

NA: No se aplicó; NS: No se recibió suero solo epitelio; -: Negativo; ±: dudoso
 EIT B: Enzyme linked immunotransfer blot ELIS A: Enzyme linked immunosorbent assay

primario de infección y en que se puede encontrar el virus por más de 28 días post infección [19].

Para llevar a cabo un análisis diagnóstico del material clínico es importante producir datos de buena calidad. Para esto, se debe contar con un protocolo de diagnóstico validado que asegure que el sistema está trabajando apropiadamente y se realiza una correcta clasificación de las muestras en positivas o negativas [20]. Cuando en un laboratorio se va a implantar el diagnóstico por técnicas moleculares como el PCR se puede utilizar reactivos procedentes de un juego comercial o un protocolo optimizado en el laboratorio, donde se utilicen cebadores reportados por laboratorios de referencia. En estos casos no es necesario realizar una completa validación, pero se debe verificar si se reproduce el límite de detección (el cual es una medida de la sensibilidad analítica de la prueba), publicados en el prospecto del juego de reactivos o en la publicación de referencia. El segundo paso es demostrar la

repetibilidad de los resultados, ya que ésta afecta la precisión [21].

El objetivo del presente trabajo fue la Aplicación de la técnica de PCR para el diagnóstico de Fiebre Aftosa en el laboratorio oficial designado, utilizando metodologías validadas por el Centro Panamericano de Fiebre aftosa y la OIE. Para ello, se verificó la sensibilidad y la precisión de las metodologías de RT-PCR en gel y en tiempo real optimizadas en las condiciones del Laboratorio de Biología Molecular y su aplicación en muestras de campo.

II. METODOLOGÍA

Muestras

En la evaluación de la sensibilidad se utilizó ARN positivo de referencia del virus de FA serotipo O proveniente del Instituto Agropecuario de Colombia

(ICA-Colombia). La evaluación de la repetibilidad se realizó preparando un homogenado de tejido epitelial infectado (Brote del 2010, Ecuador) del banco de epitelios del “Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Dr Leopoldo Izquieta Pérez” (Actualmente Instituto Nacional de Salud Pública, INSPI). Se analizaron cinco muestras de extractos celulares tratadas con un inactivante viral, las cuales fueron enviadas por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa para el diagnóstico de FA y Estomatitis vesicular y la tipificación por RT-PCR.

Además, se aplicó la metodología normalizada en el análisis por RT-PCR con los cebadores Poli A/Poli B, de 44 muestras de epitelio de bovinos (Tabla I). La metodología de RT-PCR en tiempo real se aplicó a 10 lavados esófago-faringeos de bovinos. Estas muestras procedían de diferentes provincias del país y habían sido tomadas como parte del programa de vigilancia epidemiológica dentro del proyecto de erradicación.

Diagnóstico serológico

Se realizó la detección de anticuerpos dirigidos contra las proteínas no capsidales del virus de la Fiebre Aftosa (3ABC, 3D, 2C, 3B y 3A) en las muestras de suero acompañantes de las muestras de epitelio. Se utilizó en primer lugar el ELISA (Prueba tamiz – Bovino, Centro Panamericano de Fiebre aftosa) y si era dudoso se aplicó el EITB (Enzyme linked immunotransfer blot) (Prueba confirmatoria-Bovino, Centro Panamericano de Fiebre aftosa).

Extracción del ácido nucleico

Se siguió la metodología establecida por en el Centro Panamericano de Fiebre aftosa [22]. Brevemente, se tomaron 100 mg de tejido que fueron macerados usando 1 mL de TRIzol® (Life technologies), se mezclaron en forma vigorosa por 15s y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Se añadió 400 µL de cloroformo a la mezcla y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Los ARNs totales se precipitaron con isopropanol, se diluyeron en 50 µL de agua libre de nucleasas y almacenaron a -70°C hasta su utilización.

Retro-transcripción

El proceso de retro-transcripción se realizó con el juego de reactivos “Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit” (ROCHE) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en el termociclador Swift MaxPro (Esco Healthcare Pte. Ltda.) con un perfil térmico de 25°C por 10 min, 55°C por 40 min y 85°C por 15 min. Los productos se almacenaron a -20°C.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizó la metodología validada por el Centro Panamericano de fiebre aftosa [22]. La amplificación por PCR se realizó en 50 µL conteniendo buffer PCR Green Flexi (PROMEGA) 1X, MgCl2 (1.5 mM), dNTPs (0.2 mM) y cebadores forward y reverse (0,5 µM). Los cebadores que se usaron de acuerdo a la especificidad se pueden encontrar en la Tabla II. Los perfiles térmicos fueron: para poly A-B, un ciclo de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 65°C por 1 min y 72°C por 1 min, y una extensión final 72°C por 5 min. Para el serotipo A, el perfil térmico fue de un ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, y 1 min a 72°C, seguido de un ciclo de 5 min a 72°C. Para los serotipos O y C el perfil térmico fue un ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C y un ciclo final de 5 min a 72°C. Los productos de la amplificación se analizaron mediante un gel de agarosa al 1.5%, a 100 V por un tiempo de 45 min, con un marcador de peso molecular (Trackit 100pb Invitrogen).

PCR en Tiempo Real

Se realizó la PCR en tiempo real, para la región 3D del gen de la polimerasa viral [18], usando el kit Light Cycler 480 Probes Master (ROCHE) en un volumen de 20 µL. Se colocó la mezcla de los reactantes “Probe Master Mix” (Roche) al 1X, primer 3DF: 5'-ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA-3', primer reverso 3DR 5'-GCGAGTCCTGCCACGGA-3', y sonda TAQMAN 3D (FAM- 5' TCCTTTGCACGCCGTGGGAC 3'-TAMRA). Finalmente, la PCR se llevó a cabo en un

Tabla II. Cebadores utilizados en la PCR para diagnóstico de Fiebre Aftosa y la tipificación.

Especificidad	Primer	Sentido	Secuencia (5'- 3')
FMDV	Poli A	Forward	GCAGTGACGCCATGAACATC
FMDV	Poli B	Reverse	CCTGCCACGGAGATCAACTT
FMDV	d (NK 72)	Reverse	GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC
FMDV - O	1C 564	Forward	AATTACACATGGCAAGGCCGACGG
FMDV - A	1C 562	Forward	TACCAAATTACACACGGGAA
FMDV - C	1C 536	Forward	TACAGGGATGGGTCTGTGTGTACC

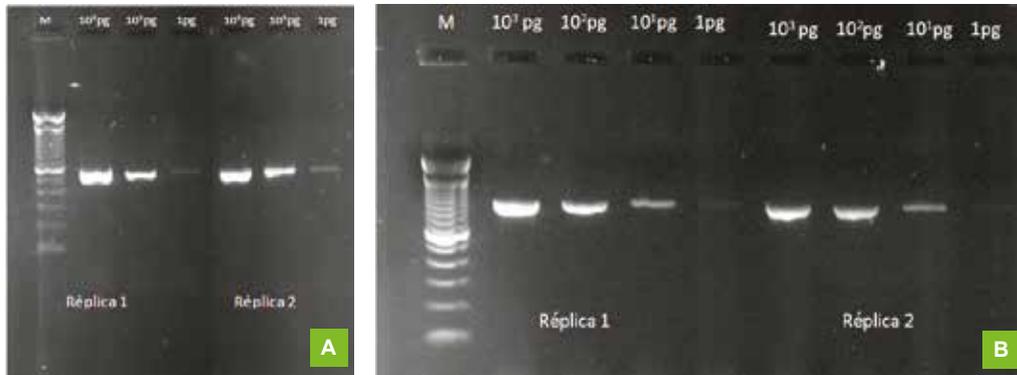


Figura 1. Sensibilidad analítica del RT-PCR de Fiebre Aftosa. Electroforesis en agarosa 2% de los productos de PCR obtenidos de diluciones seriadas de ARN de FA serotipo O en macerado de tejido epitelial sano. Se muestran dos replicas. a) Cebadores Poli A y Poli B. b) Cebadores para el serotipo O (1C564-F y NK72).

Termociclador Light Cycler 450 (ROCHE). El perfil térmico fue de 1 ciclo por 10 min a 95°C, 45 ciclos de 10 seg a 95°C, 30 seg a 56°C y 20 seg a 72°C.

Verificación de la Sensibilidad Analítica

Se trabajó a partir de ARN positivo de referencia se determinó la concentración en el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc.). Se preparó una concentración de 2000 pg/μL y se realizaron cuatro diluciones base 10 seriadas del ARN control en agua que contenían 1000 pg, 100 pg, 10 pg y 1 pg para el límite de detección en agua de la PCR. El límite de detección fue verificado en 7 réplicas para asegurar la estabilidad de la señal. Se realizó la reverso transcripción y la PCR de estas diluciones para Poly A-B y para el serotipo O, finalmente se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Posteriormente se contaminó de igual forma tejido epitelial sano de un animal en lugar de agua y se realizó la RT-PCR tres veces consecutivas.

Repetibilidad de la PCR en gel

Se tomaron 0.5 g de tejido epitelial infectado por el virus de FA serotipo O y se maceraron en 4.5 mL de buffer salino fosfato. Se repartieron en 18 alícuotas para 2 técnicos distintos, 9 para cada uno. Se realizaron 3 repeticiones en días diferentes de la metodología para detección del virus de FA, las cuales constaron de extracción, retro-transcripción, PCR para POLY A-B y serotipo O. Se incluyó un control negativo de animal sano para cada repetición.

Ensayo Interlaboratorio

Como parte de verificación del desempeño de la metodología se participó en el Ensayo Interlaboratorio Regional de 2013 organizado por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Se analizaron cinco muestras codificadas.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diagnóstico de Fiebre Aftosa y serotipo O

Se optimizaron las condiciones de retro-transcripción y PCR del ensayo en cuanto a concentración de enzimas, cebadores, MgCl₂ y perfiles de temperatura (resultados no mostrados).

La electroforesis de los productos de RT-PCR con los juegos de cebadores Poli A/Poli B y 1C564/NK72 mostraron un único fragmento de la talla esperada, 540 pb y 790 pb respectivamente en todas las suspensiones de epitelio sano contaminadas con diferentes concentraciones de ARN de FA. El marcador de peso molecular usado fue el 100 bp. En la figura 1 a y 1 b se

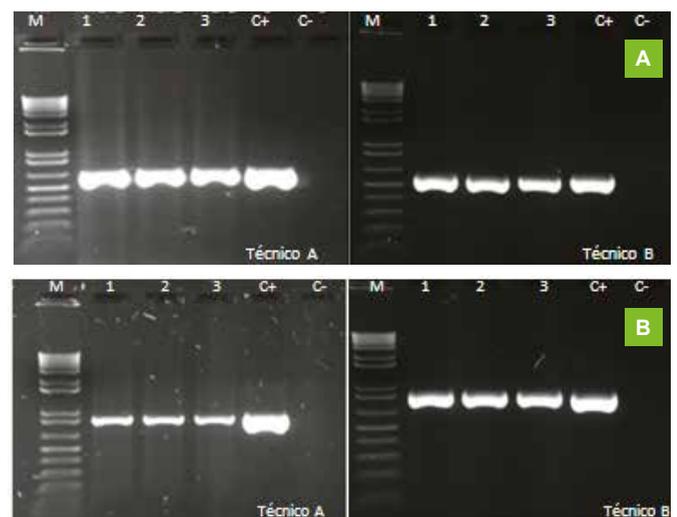


Figura 2. Repetibilidad del RT-PCR de Fiebre Aftosa. Electroforesis en agarosa 1.5% de los productos de PCR obtenidos de tres réplicas con una muestra de epitelio infectado por el virus de FA serotipo O proveniente del banco de epitelios del INSPI Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (Brote del 2010, Ecuador). a) Cebadores Poly A y Poly B. b) Cebadores para el serotipo O (1C564-F y NK72).

Tabla III. Resultado del análisis por RT-PCR de Fiebre Aftosa de cinco muestras codificadas en el Ensayo Interlaboratorio Regional de 2013 organizado por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa

Diagnóstico RT-PCR					
Muestras	Poli A y B	FA (A)	FA (C)	FA (O)	Muestra Negativa
0035J	+	-	-	+	-
0552G	-	-	-	-	+
0624I	-	-	-	-	-
0061F	+	-	+	-	-
0803H	-	-	-	-	-

+ Positivo - Negativo

muestran dos de las siete repeticiones que se realizaron para cada juego de cebadores. La amplificación en la dilución de 1 pg mostró una banda débil.

Repetibilidad de la PCR en gel

Se observó una banda de la talla esperada en todas las réplicas (Figura 2a y 2b) donde se muestran las repeticiones de RT-PCR del día 1 con ambos juegos de cebadores. La repetibilidad se ve afectada por el factor operador que realizó el ensayo como se muestra en las Figura 2a y 2b, el técnico B obtuvo menor intensidad de banda en las tres réplicas (Figura 2a y 2b). Similares variaciones se obtuvieron durante los tres días que se repitió el ensayo.

Aplicación del PCR en gel de Fiebre Aftosa dentro del Programa de Erradicación de la Fiebre Aftosa

Todas las muestras fueron negativas al virus de la Fiebre Aftosa, por lo que no se aplicó el PCR de sero-tipificación. De las 44 muestras de epitelio analizadas por RT-PCR en gel no todas venían acompañadas por suero del animal, por lo que no se pudo comparar el resultado de la RT-PCR con la serología en cinco animales del 2012 y uno del 2013. Concordaron los resultados negativos de la detección de ácidos nucleicos con la detección de anticuerpos en 38 casos (Tabla I).

Como resultado del análisis por PCR, de las cinco muestras problema enviadas por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa en el marco del ensayo interlaboratorio, todas las muestras se diagnosticaron correctamente. (Tabla III).

Sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real de Fiebre Aftosa

Se optimizaron las condiciones de retro-transcripción con la enzima Transcriptor (Roche) y PCR en tiempo real utilizando un juego de cebadores y sonda que amplifica una región del gen de la polimerasa. Se probaron variaciones de las concentraciones de cebadores y sonda. Con el ensayo optimizado la

sensibilidad del PCR en tiempo real fue hasta 1 pg (Figura 3) donde se obtuvo un valor de ciclo umbral (Ct) de 32.4.

Aplicación de la RT-PCR en tiempo real para la confirmación de ausencia de infección del virus de la Fiebre Aftosa

Se analizaron 10 muestras de fluido orofaríngeo mediante RT-PCR en tiempo real, no se obtuvo amplificación (Figura 4) para el virus de Fiebre Aftosa. Estos resultados concuerdan con el aislamiento viral efectuado en SENACSA, Paraguay donde habían sido negativos.

La Fiebre Aftosa es altamente contagiosa de rápida diseminación, debido a que el virus tiene la habilidad de transportarse a varios sitios del organismo animal e iniciar la infección, requiriendo una pequeña dosis infectiva y un corto periodo de incubación. Los animales infectados excretan grandes cantidades de virus, incluso antes del inicio de los signos clínicos [23,24]. Además es capaz de diseminarse a través del aire a grandes distancias y puede sobrevivir en el ambiente [25].

Existen otras tres enfermedades virales llamadas vesiculares que producen en rumiantes y porcinos signos clínicos indistinguibles de los de FA. Una de estas enfermedades es la estomatitis vesicular que se considera endémica y de menor impacto económico que la FA por lo que el diagnóstico de laboratorio es indispensable para determinar cuál es el agente etiológico [26]. Para el diagnóstico de laboratorio de FA se requieren métodos rápidos que puedan detectar la enfermedad tempranamente con una alta confiabilidad, antes de que el virus se disemine a otros predios no afectados [12, 27]; por lo tanto, los métodos de diagnóstico de elección, son aquellos que ponen en

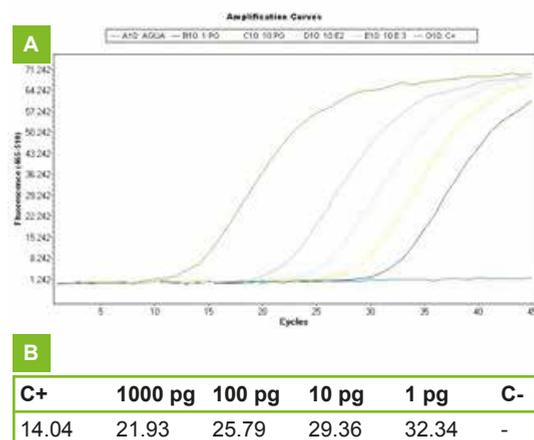


Figura 3. Resultado del estudio de la sensibilidad analítica del RT-PCR en tiempo real para el virus de Fiebre Aftosa. a) Curvas de amplificación b) valores de ciclo umbral (Ct).

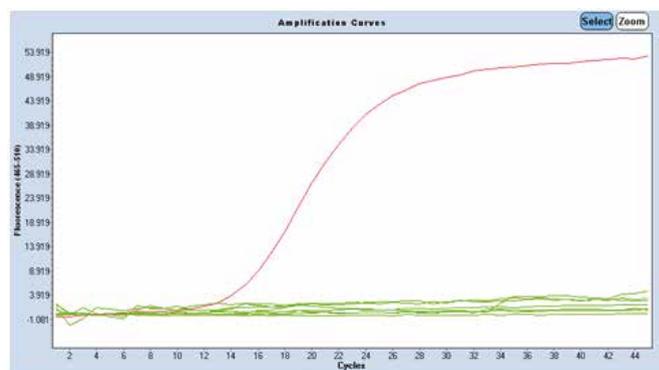


Figura 4. Curva de amplificación del RT-PCR en tiempo real para el virus de Fiebre Aftosa en muestras de fluido orofaríngeo colectadas dentro del Programa Nacional de Erradicación de Fiebre Aftosa.

evidencia la presencia del virus, su genoma, o sus antígenos y las muestras ideales por la carga viral que contienen, son el epitelio y/o el líquido de las vesículas que se forman durante la infección principalmente la boca, la lengua, el morro y las patas, también se puede utilizar el fluido orofaríngeo en los rumiantes y el exudado faríngeo en porcinos [1]. En rumiantes el virus puede persistir más allá de los 28 días en la orofaringe de los llamados portadores donde puede persistir por meses hasta 3 años [28]. La persistencia ocurre con incidencia variable independientemente del estatus de vacunación, el curso de la enfermedad, la cepa y la dosis y factores del hospedero que incluyen sexo, y edad [29]. El aislamiento del virus de tales animales se hace muy difícil durante este periodo. La RT-PCR en tiempo real por su elevada sensibilidad ha sido utilizado para la detección de ARN de FMD virus en los lavados esófago faríngeos de bovinos [23, 29], también la detección de anticuerpos a proteínas no estructurales tanto por ELISA (ELISA 3ABC) como prueba de tamizaje, así como por EITB han demostrado su utilidad para diferenciar anticuerpos post vacunales de los originados post infección [28]. Ambas técnicas deben ser usadas para detectar cualquier animal portador durante el monitoreo de seguimiento después de alcanzar el estatus de *libre con vacunación*.

Se han desarrollado varios protocolos de RT-PCR en gel y en tiempo real para el diagnóstico de FA que han sido validados por laboratorios de referencia a escala nacional y ensayos inter-laboratorios internacionales [15, 16, 12, 31]. El protocolo de PCR en gel, aplicado en el presente estudio fue estandarizado por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y optimizado para las condiciones de nuestro laboratorio de acuerdo a la NTE-ISO/IEC 17025:2006.

El estudio de sensibilidad y repetibilidad de la tipificación por PCR, se realizó solo en gel para el serotipo O, debido a que este es el único serotipo que ha circulado en Ecuador hasta el último brote informado

en el 2011, cuyas muestras de epitelio fueron conservadas por el mencionado instituto (Ver sección Metodología). La PCR en gel es un método cualitativo por lo que el criterio de evaluación óptima fue la presencia de una sola banda con el peso molecular correspondiente. Se obtuvo una alta sensibilidad de 1pg, resultado esperado para un ensayo PCR. En el ensayo de repetibilidad se observó una menor intensidad en las bandas en algunas réplicas, lo cual puede atribuirse al diferente nivel de destreza técnica. Se evaluó también la sensibilidad de un ensayo de PCR en tiempo real con un juego de cebadores y sondas que amplifican una región del gen de la polimerasa, altamente conservado dentro de los virus de Fiebre Aftosa, por lo que se puede detectar cualquier serotipo. La sensibilidad obtenida fue comparable a la de otros reportes de validación de este ensayo [2, 27]. La ventaja principal de la PCR en tiempo real es su rapidez para obtener los resultados pues se observa amplificación en el mismo momento que está ocurriendo la reacción, y no hay que esperar un tiempo posterior de revelado por electroforesis [14].

IV. CONCLUSIONES

Ecuador se encuentra en una fase avanzada dentro del Programa de Erradicación de la Fiebre Aftosa ya que no ha presentado focos desde el año 2011, esto tiene una gran repercusión económica porque abre los mercados a las exportaciones de animales, carne y leche. Disponer de un ensayo de diagnóstico rápido y de alta sensibilidad en un laboratorio oficial, ha permitido demostrar la ausencia de infecciones de Fiebre Aftosa en Ecuador durante la vigilancia pasiva y la detección de portadores. Los ensayos de RT-PCR aplicados pueden ser utilizados como complemento de otras técnicas diagnósticas, tanto para la investigación de la eficiencia de las campañas de control y erradicación como para certificar poblaciones libres de FA.

Agradecimientos

Agradecemos a la Agencia de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) y al proyecto Prometeo de SENESCYT por el financiamiento de este trabajo y al Dr. Luis Ramos por impulsar los trabajos de investigación.

Referencias

- [1] OIE (2015) "Foot and Mouth Disease". En "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Capítulo 2.1.5. En línea http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standard_s/tahm/A_index.htm. revisado 18 de mayo 2015
- [2] S.M. Reid, V. Mioulet, N.J. Knowles, N. Shirazi, G.J.

- Belsham, P. Donald, S.M. King. (2014) "Development of tailored real-time RT-PCR assays for the detection and differentiation of serotype O, A and Asia-1 foot-and-mouth disease virus lineages circulating in the Middle East". *J. Virol. Methods.* 207 (Agosto), 146–153.
- [3] E. Maradei, C. Pérez, V. Malirat, G. Salgado, C. Seki, A. Pedemonte, P. Bonastre, R. D'Aloia, J. L. La Torre, N. Mattion, J. Rodríguez Toledo, I.E. Bergmann (2011) "Characterization of foot-and-mouth disease virus from outbreaks in Ecuador during 2009–2010 and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region". *Vaccine.* 29, 8230–8240.
- [4] C.A. Palacios (1968) "Estudios sobre vacunas de virus vivo contra la fiebre aftosa". En: Organización Panamericana de la Salud. Reunión Interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis (RICAZ). OPS, Washington, DC, 19-27.
- [5] V. Malirat, I.E. Bergmann, R. de Mendoca-Campos, G. Salgado, C. Sánchez, F. Conde, F. Quiroga. J. L. Quiroga, S. Ortiz (2011) "Phylogenetic analysis of Foot-and Mouth disease virus type O circulating in the Andean region of South America during 2002-2008". *Vet. Microbiol.* 152 (Aug 29), 74-87.
- [6] A. Lindholm, E. Hewitt, P. Torres, M. Lasso, C. Echevarria, J. Shaw, J. Hernandez (2007) "Epidemiologic aspects of foot and mouth disease in Ecuador". *Int. J Appl. Res. Vet. Med.* 5(1), 17-23.
- [7] AGROCALIDAD (2004) Ley de Erradicación de la Fiebre Aftosa. Registro Oficial. 16 de abril de 2004. Suplemento N° 315 En línea <http://www.agrocalidad.gob.ec/normativa-legal-sanidad-animal/>. (revisado 18 de mayo 2015)
- [8] AGROCALIDAD (2011) Resolución 005. Registro Oficial. 23 de Junio del 2011. Suplemento N° 476. En línea <http://www.agrocalidad.gob.ec/normativa-legal-sanidad-animal/> (revisado 18 de mayo 2015)
- [9] AGROCALIDAD (2014) RESOLUCIÓN OAJ-2014404-0201 .0361. En línea <http://www.agrocalidad.gob.ec/normativa-legal-sanidad-animal/> (revisado 18 de mayo 2015).
- [10] OIE WAHID. En línea http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail . (revisado 18 de mayo. 2015)
- [11] A.E. Shaw, S. M. Reid, D. P. King, G. H. Hutchingsom, N. P. Ferris (2004) "Enhanced laboratory diagnosis of foot and mouth disease by real-time polymerase chain reaction". *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 23 (3), 1003-1009.
- [12] N. P. Ferris, D. P. King, S. M. Reid, G. H. Hutchings, A. E. Shaw, D. J. Paton, N. Goris, B. Haas, B. Hoffmann, E. Brocchi, M. Bugnetti, A. Dekker, K. De Clercq. (2006) "Foot-and-mouth disease virus: A first inter-laboratory comparison trial to evaluate virus isolation and RT-PCR detection methods". *Vet. Microbiol.* 117, 130–140.
- [13] A. Clavijo, P. J. Viera-Pereira, I. E. Bergmann. (2003) "Use of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for the diagnosis of foot and mouth disease in South America". *Vet. Res. Com.*; 27(1): 63-71.
- [14] E. A. Pestana, S. Belak, A. Diallo, J. R. Crowther, J. Gerrit, G. J. Viljoen (2010) "Early, rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostic- Real time Applications". Ed. International Atomic Energy Agency. Springer Netherland. ISBN: 978-90-481-3131-0 978-90-481-3132-7
- [15] S. M. Reid, NP Ferris, GH Hutchings, R Alan. AR Samuel, NJ Knowles (2000) "Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction". *J. Virol. Methods.* 89, 167–176.
- [16] M. Sáiz, D.B. De la Morena, E. Blanco, J. I. Núñez, R. Fernández, J.M. Sánchez-Vizcaino. (2003) "Detection of foot-and-mouth disease virus from culture and clinical samples by reverse transcription-PCR coupled to restriction enzyme and sequence analysis". *Vet. Res.* 34, 105–117.
- [17] FAO, (2010) "World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease (WRLFMD), genotyping report Ecuador".
- [18] J. D. Callahan, F. Brown, F.A. Osorio, J. H Sur., E. Kramer, G.W. Long, J. Lubroth, S. J. Ellis, K. S. Shoulars, K.L. Gaffney, D.L. Rock, W.M. Nelson (2002) "Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus". *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220 (11), 1636–1642.
- [19] Zh Zhang, C Murphy, M Quan, J. Knight, S. Alexandersen (2004) "Extent of reduction of foot-and-mouth disease virus RNA load in oesophageal-pharyngeal fluid after peak levels may be a critical determinant of virus persistence in infected cattle". *J. Gen. Virology* 85, 415–421.
- [20] OIE. (2015). "Principles and methods of Validation of diagnostic assays for infectious diseases". Capítulo 1.5 p, 2. En línea http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standard_s/tahm/A_index.htm. revisado 18 de mayo 2015,
- [21] E.M. Burd (2010) "Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases". *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (3), 550–576.
- [22] V. Malirat I. Bergmann (2003) "Fiebre aftosa: Instrumentos moleculares para caracterización viral. Manual RT-PCR y secuenciamiento cíclico para estudios de epidemiología molecular del virus de la Fiebre Aftosa". Organización panamericana de la Salud. Centro Panamericano de Fiebre aftosa. Serie de Manuales Didácticos. N° 17 ISSN 0101-5296. <http://bvs.per.paho.org/texcom/cd048213/fiebaftosa.pdf>
- [23] J. Arzt J, J.M. Pacheco, L.L. Rodríguez (2010) "The

Early Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Cattle After Aerosol Inoculation: Identification of the Nasopharynx as the Primary Site of Infection". *Vet. Pathol.* 47(6), 1048-1063.

[24] A. Abd El Wahed, A. El-Deeb A, M. El-Tholoth, H. Abd El Kader, A. Ahmed, S. Hassan, B. Hoffmann, B. Haas B, M.S. Shalaby , F.T. Hufert, M.Weidmann (2013) "A Portable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus". *PLoS ONE.* 8(8), e71642.

[25] R.L. Sanson, J. Gloster, L. Burgin (2011) "Reanalysis of the start of the UK 1967 to 1968 foot-and-mouth disease epidemic to calculate airborne transmission probabilities". *Vet. Rec.*169, 336.

[26] R Casas Olascoaga, I. Gomes, F.J Rosenberg, P. Augé de Mello, V. Astudillo, N. Magallanes (1999) "Fiebre Aftosa". Cap. 6. Diagnóstico. Sao Paulo . Ed Atheneu.

[27] N. Fondevila, D. Compaired, E. Maradei y S. Duffy (2014) "Validación de una técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de fiebre aftosa y evaluación de su desempeño en la infección aguda". *Rev. Argent. Microbiol.* 46(3),188-195.

[28] D. J. Paton, A. E. Füssel, W. Vosloo, A. Dekkerd, K. De Clercq (2014) "The use of serosurveys following emergency vaccination, to recover the status of foot and mouth disease free where vaccination is not practised" . *Vaccine.*32 (52)12, 7050–7056.

[29] J. M. Pacheco, G. R. Smoliga1 , V. O'Donnell, B. P. Brito, C. Stenfeldt, L. L. Rodriguez, J. Arzt (2015) "Persistent Foot-and-Mouth Disease Virus Infection in the Nasopharynx of Cattle; Tissue-Specific Distribution and Local Cytokine Expression". *PLoS ONE* 10(5): e0125698. doi:10.1371/journal.pone.0125698

[30] S. M. Reid, N.P. Ferris, G. H. Hutchings, Z. Zhang, G.J. Belsham, S. Alexandersen (2002) "Detection of all seven serotypes of foot-and-mouth disease virus by real-time, fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay". *J. Virol. Methods.*105, 67–80.

[31] D.P. King, N. P. Ferris, A. E. Shaw, S. M. Reid, G. H. Hutchings, A. C. Giuffre, J. M. Robida, J. D. Callahan, W. M. Nelson, T. R. Beckham (2006) "Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics - Real Time PCR Applications". Ed Springer, EIAE, OIE: *Vet. Diagn. Invest.* 18, 93–97.