

ARTÍCULO ORIGINAL

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

Norberto Fondevila^{a,*}, Diego Compaired^a, Eduardo Maradei^b y Sergio Duffy^c

^a Instituto de Virología, CICVyA-INTA Castelar, Hurlingham, Argentina

^b Dirección de Laboratorios, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), Martínez, Buenos Aires, Argentina

^c Instituto de Patobiología, CICVyA-INTA Castelar, Hurlingham, Argentina

Recibido el 17 de marzo de 2014; aceptado el 29 de julio de 2014

PALABRAS CLAVE

Fiebre Aftosa;
RT-PCRtr;
Diagnóstico

Resumen

Se validó una técnica de RT-PCR en tiempo real utilizando el termociclador y los reactivos del LightCycler 2.0 de Roche, según las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal, y se evaluó su desempeño para la detección del virus de fiebre aftosa en la infección aguda de bovinos vacunados e infectados experimentalmente con virus A Argentina/2001 o A24 Cruzeiro. La técnica demostró ser robusta, presentó coeficientes de variación menores del 4 % al considerar días, extracciones y repeticiones diferentes y logró detectar hasta 0,4 DICT50%, o hasta 100 moléculas de ARN. La sensibilidad diagnóstica en líquido esófago-faríngeo (LEF) fue 93,1 (IC95%: 86,5-96,6) y la especificidad diagnóstica fue 100 (IC95%: 96,3-100). Se observó protección total en lo referido a aparición de síntomas clínicos tras la infección aguda experimental con virus A Argentina/2001 o A24 Cruzeiro en animales multivacunados o vacunados 7 o 14 días antes de la exposición viral, y se pudo detectar la presencia viral por RT-PCRtr en LEF desde el primer día y hasta por lo menos el día 9 posexposición en todos los animales expuestos. Los títulos virales en estos bovinos fueron de hasta 2 log 10 inferiores que los observados en los animales con signos clínicos.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: iviro@cnia.inta.gov.ar (N. Fondevila)

KEYWORDS

Foot-and-mouth disease;
Real time RT-PCR;
Diagnosis

Validation of a real time RT-PCR assay to detect foot-and-mouth disease virus and assessment of its performance in acute infection

Abstract

A specific real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCRrt) for the detection of foot-and-mouth disease virus was validated using the LightCycler thermocycler 2.0 and its reagents as recommended by the World Organization for Animal Health and was assessed for the detection of the virus in acute infection of cattle experimentally vaccinated and challenged with virus A Argentina/2001 or A24 Cruzeiro. The technique proved to be robust, showing coefficients of variation lower than 4% for different ARN extractions, days or repetitions and was able to detect up to 0,4 TCID₅₀, and/or up to 100 RNA molecules. In probang samples, diagnostic sensitivity was 93.1 (95% CI 86.5-96.6) and diagnostic specificity 100 (95% CI 96.3-100). The results of the challenge in vaccinated or multivaccinated bovines showed that although there were high levels of clinical protection in the vaccinated group, FMDV could be detected in all challenged groups. However, detection was 100 times lower in immunized animals. © 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La fiebre aftosa (FA) es una de las enfermedades más temidas en las especies domésticas debido a las pérdidas económicas que ocasiona, ya sea por la disminución de la productividad y la mortalidad que causa, o por los costosos programas que resultan necesarios para lograr su control o erradicación. A ello se suma el efecto negativo en la comercialización internacional que sufren los países con FA.

La enfermedad es altamente contagiosa y en poblaciones susceptibles se difunde rápidamente entre los animales. Sin embargo, luego de la introducción del virus en una zona libre, con vacunación o sin esta, el virus puede difundirse de manera subclínica o con un número muy reducido de animales enfermos, e incluso con síntomas confusos^{8,9,16}. Conociendo que el principal mecanismo de la diseminación de FA es el contacto directo entre animales infectados y susceptibles, principalmente en el período agudo de la enfermedad¹, es fundamental identificar a estos animales para impedir el contagio y así lograr un efectivo control de la enfermedad. Por ello es imprescindible contar con métodos diagnósticos capaces de identificar animales infectados con el virus de fiebre aftosa (VFA) de manera rápida, aun cuando la cantidad de virus presente en el animal sea baja (animales en período de incubación o infectados asintomáticos).

En la actualidad se está generalizando cada vez más el concepto de utilizar técnicas debidamente validadas con respecto a la aplicación a que se destinan, con vistas a garantizar la fiabilidad de los resultados de los ensayos¹². En el caso de la FA -una de las enfermedades de mayor importancia en medicina veterinaria-, la aplicación de este concepto ya es una obligación en los servicios oficiales, pero también comienza a ser un requisito para los trabajos de investigación. Por esta razón, se utilizó una técnica de RT-PCR en tiempo real (RT-PCRtr) recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE¹², validándola para el termociclador y los reactivos del LightCycler 2.0 Roche, según las recomendaciones de la OIE. Posteriormente se estudió la infección aguda de bovinos con diferentes niveles inmuno-

lógicos, los que fueron infectados experimentalmente con virus A Argentina/2001 y A24 Cruzeiro, a fin de evaluar su desempeño en muestras de líquido esófago-faríngeo (LEF).

Materiales y métodos

Virus: Para confirmar la factibilidad de la técnica se utilizaron cepas de virus O1 Campos, C3 Indaial, A Argentina/2001, A24 Cruzeiro, A22, Asia 1, SAT1, SAT2 y SAT3 en sobrenadantes de cultivos inactivados con etilenimina binaria (BEI) o líquido esófago-faríngeo (LEF) en Trizol. Estas cepas fueron obtenidas de dos laboratorios de referencia: el *Institute for Animal Health Pirbright Laboratory* (IAH) y el Servicio Nacional de Sanidad Animal de Argentina (SENASA). Para la descarga viral se utilizó virus A24 Cruzeiro o A Argentina/2001 provenientes del SENASA.

Titulación viral: Para la titulación viral se utilizaron monocapas de BHK-21 entre pasaje 88 y 100, en placas de 96 pocillos. Se realizaron diluciones al décimo del virus, inoculándolas por cuadruplicado. El título de los virus se expresó como dosis infecciosas en cultivo de tejido 50 % por ml (DICT50%/ml), que representó el logaritmo de la inversa de la dilución del virus que produjo efecto citopatogénico en el 50 % de los pocillos inoculados, calculado por el método de Reed y Muench¹⁴.

Transcripción inversa: Se sintetizó el ADNc mediante una reacción de transcripción inversa (RT) a partir de los ARN. Para ello se realizó una mezcla de reacción con 1 µl del ARN extraído, 1 µl de buffer RT 5x (Promega); 0,5 µl de dNTP 10 mM (Promega); 0,125 µl de ARNsin 40U/µl (Promega); 0,25 µl de *random primers* 2 µg/µl; 0,175 µl de transcriptasa inversa 200 U/µl (Promega), y se completó con 1,95 µl de H₂O (libre de DNAasa/RNAasa) para obtener un volumen final de 5 µl. La reacción se efectuó en un Termociclador Biometra Trio con el siguiente régimen de ciclo: 45 min a 42 °C, 10 min a 94 °C, 4 min a 4 °C.

Para la técnica de RT-PCRtr se utilizaron los cebadores y la sonda marcada desarrollados por Callahan *et al.*³. En la

reacción de PCRtr se utilizó una mezcla que contenía 2 μ l de cada uno de los *primers* T1 y T2³ (0,5 μ M); 0,4 μ l de sonda TAQ 0,1 μ M; 4 μ l de Master mix LightCycler Taqman (Roche); 10,6 μ l de H₂O (libre de DNAasa/RNAasa) y 1 μ l de ADNc. La reacción se realizó en un termociclador LightCycler 2.0 Roche, con las siguientes condiciones del ciclo: 10 min a 95 °C, 45 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C, donde se realizó la lectura de emisión fluorescente de las muestras a 530 nm.

Se consideraron positivas las muestras que presentaban un aumento geométrico en la emisión de fluorescencia en dos ciclos sucesivos anteriores al ciclo número 45, con una calificación adjudicada por el software LightCycler 4.05 superior a 4,5. Se consideró al primero de estos ciclos de elevación de emisión como primer ciclo de positividad (cp). Se utilizó un ARN extraído de una preparación correspondiente al aislado A Argentina/2001 con título de 500 UFP como control positivo, y un ARN extraído de sobrenadante de células BHK-21 sin infectar como control negativo.

Validación de la RT-PCRtr

Factibilidad: Para confirmar la capacidad del método para detectar los 7 subtipos virales del VFA se utilizaron cepas pertenecientes a VFA tipo O, A, C, Asia 1, SAT1, SAT2 y SAT3.

Repetibilidad: Se realizaron 20 repeticiones utilizando el control positivo y negativo descrito en la técnica de RT-PCRtr. Con los resultados del cp se obtuvieron valores estadísticos de promedio y desvío estándar.

Reproducibilidad: Se realizó un experimento donde se realizaron 3 extracciones diarias del control positivo, procesadas por duplicado (6 muestras positivas) en 3 días diferentes. Los resultados obtenidos del cp fueron analizados por modelo de análisis de varianza anidado.

Determinación de parámetros críticos: Se analizó el impacto de la variación de los principales componentes de las mezclas de reactivos (transcriptasa inversa, dNTP, cebadores, sonda marcada), realizando 6 réplicas de la muestra del control positivo utilizando las concentraciones indicadas para cada reactivo \pm 10 % del volumen establecido en la técnica.

Determinación de la especificidad y la sensibilidad analítica

Sensibilidad analítica: Utilizando la cepa A24 Cruzeiro, se realizaron diluciones al décimo para determinar la menor cantidad del virus detectada por la técnica. La presencia viral en cada alícuota se estudió por PCRtr y aislamiento viral en BHK-21.

Por otro lado se utilizó el plásmido pTOPO-F3B, que contiene la secuencia que codifica para 3D de A Argentina/2001 (nucleótidos 4510 al 8200)⁵. Con este se sintetizó ARN utilizando Ribomax T7 (Promega) para obtener el ácido nucleico, que fue cuantificado por espectrofotometría. Luego se realizaron diluciones, se obtuvo así desde puro hasta 10⁻¹⁰; ese material se analizó por RT-PCRtr en tiempo real, a fin de evaluar las moléculas de ácido nucleico detectadas en la técnica^{2,17}.

Especificidad analítica: Para comprobar que el método no produce reacciones positivas debido a los componentes de las matrices utilizadas o a la presencia de otros virus, se procesaron 100 muestras que incluyeron sobrenadantes de macerados de órganos (19 ganglios, 20 epitelios linguales, 19 faringes), 22 LEF provenientes de animales libres de VFA y 5 sobrenadantes de cultivos BHK-21 libres de virus adventicios, incluyendo sobrenadantes de cultivos virales de enterovirus bovino (n=5), virus de enfermedad vesicular del cerdo (n=5), herpesvirus bovino (n=5) y virus de la diarrea viral bovina (n=5).

Evaluación del desempeño de la técnica de RT-PCRtr en muestras de LEF de animales expuestos a VFA: Todas las experiencias con desafío viral en bovinos se llevaron a cabo en instalaciones con nivel de bioseguridad 3 Agricultura del INTA Castelar. Todas las maniobras con los animales de experimentación se realizaron bajo normas de bienestar animal según el *National Research Council*¹¹.

Animales libres de VFA: Se procesaron 100 muestras de LEF de bovinos provenientes de zona libre de VFA con vacunación (tabla 1). Todos los animales fueron negativos a la presencia de anticuerpos contra proteínas no estructurales del VFA (antígenos diferenciales de animales vacunados respecto de infectados).

Tabla 1 Resumen de la procedencia de las muestras de líquido esófago-faríngeo (LEF) procesadas para la evaluación del desempeño de la técnica de RT-PCR en tiempo real

N.º animales	Desafío de virus aftosa	Subtipo	Dosis de desafío ^a	Vía de exposición	N.º muestras de LEF obtenidas	Dpi ^b
100	No	-	-	-	100	-
102	Sí	A2001-A24	10 ⁴	Intradermolingual	102	7-12
50	Sí	A24	10 ⁴	Intradermolingual	50	7-15
50	Sí	A2001	10 ⁴	Intradermolingual	50	7-15
15	Sí	A2001	10 ⁴	Intranasal	135	1-28
2	Sí	A24	-	Contacto con animal infectado	18	1-14
2	Sí	A2001	-	Contacto con animal infectado	18	1-14

^a Expresado como dosis infecciosas 50 %.

^b Días posinfección en que fueron obtenidas las muestras.

Animales en el período agudo de la enfermedad

Animales desafiados por vía intradermolingual: Se analizaron 102 muestras de LEF de novillos desafiados por vía intradermolingual con 10^4 DICT50% de virus serotipo A, obtenidas entre los 7 y 12 días posdesafío de animales que presentaban lesiones de generalización podal (tabla 1).

Animales desafiados por vía intranasal: Se analizaron muestras de LEF provenientes de 15 bovinos libres de fiebre aftosa: 5 no vacunados y 10 vacunados con una vacuna comercial argentina que había aprobado los controles oficiales. La vacunación se efectuó 7 o 14 días antes del desafío en dos grupos de 5 animales cada uno. Los animales fueron desafiados por vía intranasal con 10^4 DICT50% de virus A Argentina/2001; las muestras de líquido esófago-faríngeo de cada animal se obtuvieron en los siguientes días posexposición: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 21 y 28 (tabla 1).

Animales vacunados desafiados por contacto: Cuatro bovinos que habían recibido al menos 3 vacunaciones dentro de la campaña normal de control -que se realiza oficialmente en Argentina con vacuna oleosa tetravalente (antígenos A Argentina/2001, A24 Cruzeiro, O1 Campos, C3 Indaial)- y que presentaban títulos altos de anticuerpos circulantes medidos por ELISA fase líquida¹⁴ contra la cepa que fueron desafiados ($\geq 1,90$ para A24 Cruzeiro o $\geq 2,20$ para A Argentina/2001, expresado como la inversa del logaritmo decimal de la mayor dilución que presentó el 50 % de la absorbancia de los pocillos con antígeno sin suero) fueron expuestos por contacto a dos bovinos que habían sido desafiados por vía intradermolingual y se encontraban con signos clínicos (lesiones vesiculares en boca y patas). Dos fueron expuestos por contacto a dos bovinos que habían sido inoculados con 10^4 DICT50% del virus A Argentina/2001, los otros dos fueron expuestos a dos bovinos inoculados con virus A24 Cruzeiro. La exposición se prolongó durante 10 días. Se obtuvieron muestras de líquido esófago-faríngeo durante el período de exposición (tabla 1).

Procesamiento de muestras

Las muestras de LEF fueron tratadas con cloroformo (con una relación 1:0,7), agitadas por 1 min y centrifugadas a 5000 rpm, se diluyó una parte del sobrenadante en 4 partes de Trizol®. Para la extracción del ARN, las muestras fueron procesadas utilizando Trizol® según las instrucciones del fabricante.

Análisis estadísticos: Las comparaciones entre días, extracciones y repeticiones se efectuaron por análisis de varianza anidado; las comparaciones entre los títulos de ARN obtenidos en las distintas categorías de animales se realizaron por análisis de varianza o por el test no paramétrico Mann-Whitney. Los cálculos estadísticos y gráficos se realizaron con el programa R¹³.

Resultados

Factibilidad: La técnica pudo detectar todos los tipos y subtipos del VFA analizados (O1 Campos, C3 Indaial, A Argentina/2001, A24 Cruzeiro, A22, Asia 1, SAT1, SAT2 y SAT3) en sobrenadantes de cultivos inactivados con BEI o en líquidos esófago-faríngeos en Trizol.

Repetibilidad: Las 20 repeticiones del control positivo presentaron un promedio de 29,59 del cp, con un desvío estándar de 0,72. Las 20 repeticiones realizadas sobre el control negativo (sobrenadante de células BHK-21) presentaron resultados negativos hasta el ciclo 45.

Reproducibilidad: Se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 4 % al procesar el control positivo en días, extracciones y repeticiones diferentes (días diferentes: 1,34 %, extracciones diferentes: 3,62 %, repeticiones diferentes: 2,44 %); la extracción del ácido nucleico fue el principal factor que ocasionó variabilidad.

Determinación de parámetros esenciales: Se evaluó el impacto que puede tener la adición de reactivos esenciales en las mezclas para la transcripción inversa o la PCR (transcriptasa inversa, dNTP, cebadores y sonda marcada). No se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los resultados obtenidos haciendo repeticiones con volúmenes superiores o inferiores al 10 % de la cantidad estipulada para la técnica con los obtenidos con la formulación correcta; los resultados obtenidos estuvieron dentro del rango de cp alcanzado normalmente con el control positivo (expresado como promedio \pm 2 desvíos estándares, según los datos presentados en el apartado de repetibilidad) para la aceptación de la técnica (tabla 2).

Sensibilidad analítica: La técnica pudo detectar hasta 0,4 DICT50% utilizando el virus A24 Cruzeiro (tabla 3) y hasta 100 moléculas de ARN con un 100 % de eficiencia (tabla 4).

Especificidad analítica: Los resultados obtenidos por RT-PCRtr en las 100 muestras analizadas, que no presentaban

Tabla 2 Efecto del cambio de volumen de diferentes componentes de la reacción de RT-PCRtr sobre el número de ciclos de positividad (cp) en el control positivo (n=6)

Reactivo	Volumen del reactivo en la reacción			
	10 % menor ^a		10 % mayor ^a	
	Promedio	Desvío estándar	Promedio	Desvío estándar
Transcriptasa inversa	27,26 ^a	0,9	27,75	0,66
dNTP	27,46	0,85	28,76	0,58
Cebadores	29,53	1,33	30,13	0,62
Sonda marcada	28,71	1,21	30,98	0,71

^a Comparado con el valor standard/normal.

Tabla 3 Detección del virus A24 Cruzeiro en diluciones entre $10^{0,6}$ y $10^{-6,4}$ mediante las técnicas de PCR en tiempo real y aislamiento en células BHK-21

Título ^a	RT-PCRtr	cp promedio ^c	Infec BHK-21 ^d
6,4	P ^b	22,25	P
5,4	P	25,46	P
4,4	P	33,68	P
3,4	P	30,99	P
2,4	P	37,01	P
1,4	P	37,06	P
0,4	P	39,80	N
-0,6	N	45,00	N

^a Dosis infecciosas expresadas en log de DICT50%/ml.

^b P = Positivo, N= Negativo.

^c Primer ciclo de positividad de cada muestra.

^d Resultado del aislamiento en células BHK-21.

Tabla 4 Detección de partículas de ácido nucleico del VFA por RT-PCRtr

Cantidad de moléculas (log 10)	Positivas ^a	cp promedio ^b	Totales ^c	Porcentaje ^d
10,02	4	8,92	4	100
9,02	4	10,25	4	100
8,02	4	14,34	4	100
7,02	4	18,57	4	100
6,02	4	22,37	4	100
5,02	4	26,38	4	100
4,02	8	31,46	8	100
3,02	8	34,91	8	100
2,02	8	38,05	8	100
1,02	2	43,1	8	25
0,02	1	44,75	8	12,5

^a Pruebas RT-PCRtr positivas.

^b Primer ciclo de positividad promedio de las muestras.

^c N.º total de pruebas realizadas.

^d % de pruebas positivas sobre totales.

el virus detectado por la técnica, fueron todos negativos hasta el ciclo 45.

Evaluación del desempeño de la RT-PCRtr para la detección del VFA

Sensibilidad y especificidad diagnóstica para LEF: Utilizando 102 muestras de LEF provenientes de animales infectados con VFA que presentaban signos clínicos (vesículas en boca y extremidades) y 100 muestras de animales libres de VFA, se obtuvo una sensibilidad diagnóstica de 93,1 (IC95%:

86,5-96,6) y una especificidad diagnóstica de 100 (IC95%: 96,3-100).

Detección de la infección en animales desafiados por vía intranasal: En los animales desafiados por vía intranasal con 10^4 DICT del virus A Argentina/2001, solamente se presentaron lesiones vesiculares en boca y patas en los animales totalmente susceptibles (no vacunados), mientras que se mostraron protegidos en términos de signos clínicos, tanto los vacunados a los 7 días como aquellos vacunados a los 14 días antes del desafío. Sin embargo, fue posible detectar la presencia del VFA en LEF por RT-PCRtr desde el primer día posexposición en todos los grupos experimentales, esto es, los animales no vacunados y los que habían sido vacunados 7 y 14 días antes del desafío (figs. 1A-1C). Cabe destacar que los resultados expresados en moléculas de ARN detectadas por RT-PCRtr demuestran títulos hasta 100 veces menores (diferencias significativas $p < 0,05$) en los grupos vacunados con respecto a los animales totalmente susceptibles.

Detección de la infección en animales desafiados por contacto: Los animales multivacunados, los desafiados con virus A24 Cruzeiro y los desafiados con A Argentina/2001 no presentaron síntomas clínicos durante toda la experiencia.

En los dos animales multivacunados expuestos a animales infectados con virus A24 Cruzeiro se detectó la presencia de ARN viral por RT-PCRtr desde el día 3 posexposición hasta el día 10 en LEF (fig. 2A).

En los dos animales multivacunados expuestos a bovinos infectados con virus A Argentina/2001 se detectó presencia de ARN viral por RT-PCRtr desde el día 2 posexposición hasta el día 10 (fig. 2B).

En los animales multivacunados expuestos a Argentina/2001 y A24 Cruzeiro, los títulos de los virus detectados en muestras de LEF a los 7 días posexposición fueron inferiores (diferencias significativas, $p < 0,05$) que los registrados en animales no vacunados (fig. 3).

Discusión

Con la finalidad de ensayar una técnica de validez que cumpliera con los requisitos de calidad, se optó por utilizar las secuencias de cebadores y sonda desarrolladas por Callahan J.³, recomendadas por la OIE¹², ya que tiene la ventaja de amplificar la región del ácido nucleico del VFA conservada que codifica la polimerasa, lo que permite detectar con una sola reacción los 7 serotipos del virus. Sobre la base de los trabajos antes citados se revalidó la técnica utilizando el termociclador LightCycler 2.0 de Roche junto con los reactivos de PCR Taq desarrollados para este equipamiento. La factibilidad del método fue demostrada por los resultados, que detectaron los 7 tipos del VFA, y su robustez se corroboró mediante las pruebas de repetibilidad, reproducibilidad, sensibilidad y especificidad analítica, así como de sensibilidad y especificidad diagnóstica, utilizando este equipamiento y sus reactivos. Estos datos confirman y complementan la información previamente publicada sobre esta técnica^{3,6,7,10}.

Durante la aparición de brotes de VFA se procede a la aplicación de estrictas y complejas medidas de control de la enfermedad para evitar su difusión, entre las cuales se aplica la inmovilización, la cuarentena, la vacunación y la

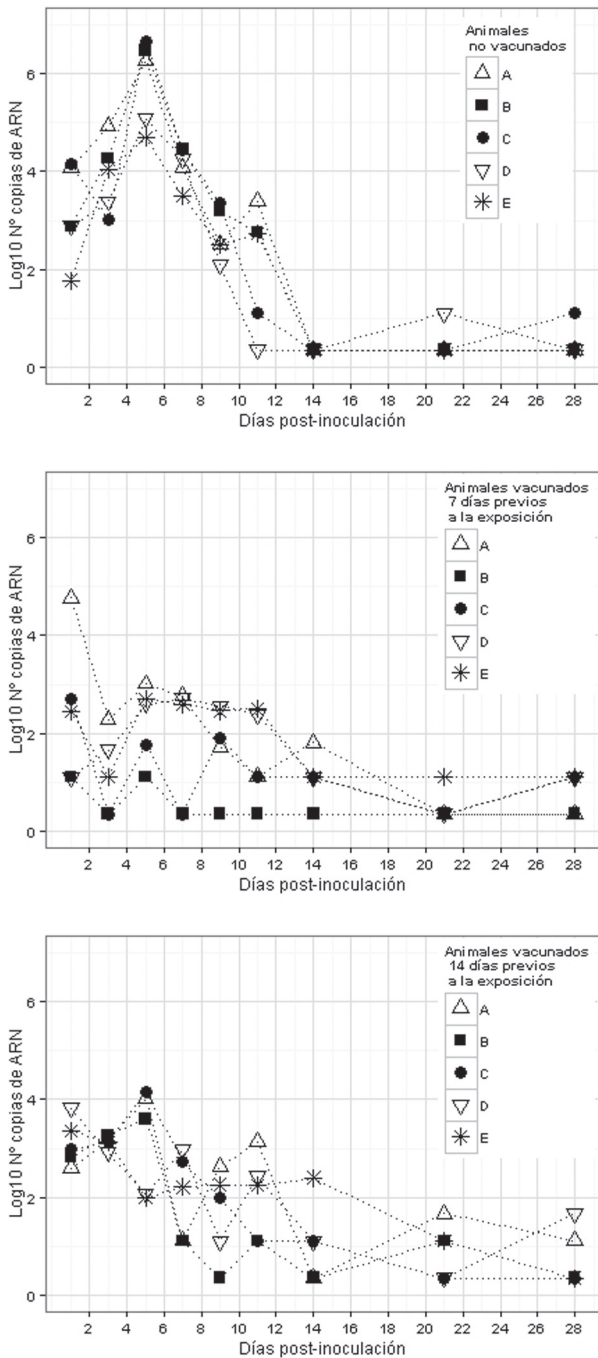


Figura 1 Detección de ARN del VFA por RT-PCRtr en líquido esófago-faríngeo de animales libres de VFA (A); vacunados 14 días antes de la exposición (B), vacunados 7 días antes de la exposición (C) y descargados intranasalmente con virus A 2001, valores expresados como log 10 del número de moléculas de ARN.

vigilancia epidemiológica de poblaciones susceptibles de infectarse con el VFA en un radio de al menos 10 km alrededor del foco. Normalmente la presencia de casos se determina por la aparición de animales con signos clínicos. En un animal con síntomas clínicos, la presencia del VFA, que normalmente tiene altos títulos en las lesiones vesiculares,

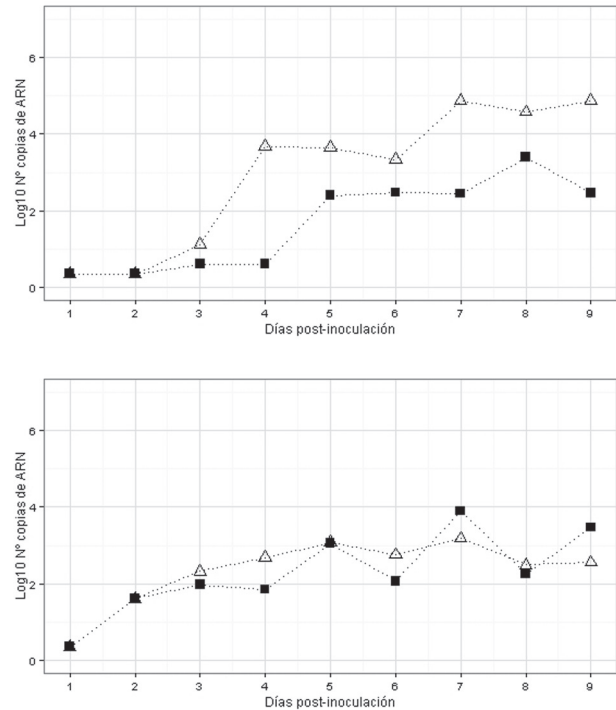


Figura 2 Detección de ARN del VFA en líquido esófago-faríngeo por RT-PCRtr en animales multivacunados expuestos a virus A24 Cruzeiro (A) y A Argentina/2001 (B), valores expresados como log 10 del número de moléculas de ARN.

puede ser detectada y confirmada por la mayoría de los métodos comúnmente utilizados en el diagnóstico (ELISA, aislamiento viral, PCR, etc.). La vacunación masiva en animales susceptibles confiere protección contra la enfermedad e impide la presentación de signos clínicos. Sin embargo, la exposición de un bovino inmunizado contra VFA, que normalmente ocurre por vía respiratoria o digestiva, puede llegar a causar su infección, pues el virus se replica principalmente en los tejidos que actúan como puerta de entrada (orofaringe, sistema respiratorio superior)¹. Esta replicación viral induce una respuesta inmunitaria secundaria que impide la llegada del virus a los órganos blanco y la aparición de lesiones. Por lo tanto, estos animales pueden albergar al virus y, aunque este se encuentre en títulos bajos, representan un riesgo dado que pueden pasar inadvertidos, ya que no presentan signos clínicos y eventualmente pueden trasladarse libremente hacia otras regiones, donde pueden entrar en contacto con animales totalmente susceptibles. Por consiguiente, en esta situación, la confirmación de nuevos casos durante la vigilancia epidemiológica no se debería realizar solamente por la detección de animales enfermos, sino por la detección de animales infectados, y en este caso, el LEF sería la muestra de elección para confirmar la presencia viral en los animales expuestos. Es por ello que en este trabajo se evaluó el desempeño de la técnica de RT-PCRtr para la detección de animales infectados en esta matriz.

La alta sensibilidad diagnóstica (93,1, IC95%: 86,5-96,6) y especificidad diagnóstica (100, IC95%: 96,3-100) obtenidas con muestras de LEF de animales con signos clínicos o libres de VFA confirmaron que esta matriz no produce un efecto

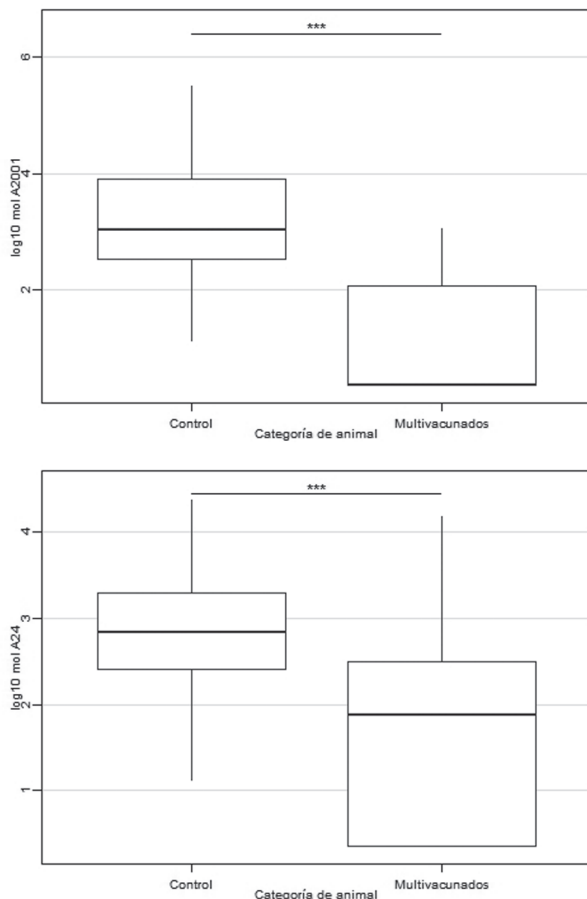


Figura 3 Gráfico de caja de la distribución de títulos de VFA detectados en animales multivacunados y controles sin vacunar (los títulos se expresan en logaritmos decimales del número de moléculas de ácido nucleico).

inhibitorio ni produce reacciones inespecíficas en la RT-PCRtr para la detección del VFA.

La vacunación de bovinos libres de VFA 7 o 14 días antes del desafío viral emularía una vacunación de emergencia alrededor del brote en animales libres de VFA. En este caso, el desafío de bovinos por instilación intranasal con virus A Argentina/2001 permitió demostrar que la inmunización efectivamente protegió a los bovinos de la enfermedad, aunque se detectó la presencia viral en todos los grupos desafiados por RT-PCRtr en el LEF desde el primer día pos-exposición. Es de hacer notar que en los animales vacunados se observaron concentraciones virales de hasta 2 log inferiores que las detectadas en los animales no vacunados (diferencias significativas $p < 0,01$), especialmente en el período comprendido entre el día 1 y 7 pos-exposición (fig. 1), lo que indicaría que la vacunación anti-VFA, aun en períodos tan cortos (7-14 días), produce una respuesta inmunitaria que induce un aumento de la resistencia del animal y disminuye así su susceptibilidad. Esto corrobora la importancia de la vacunación como herramienta de control del VFA.

En Argentina, por ley se vacuna, obligatoriamente, a todos los bovinos menores de 2 años dos veces por año, utilizando vacuna oleosa inactivada que posee 4 antígenos (O1 Campos, A24 Cruzeiro, A 2001 y C3 Indaial). Esta vacuna es

sometida a estrictos controles (inocuidad, esterilidad, físicos, estabilidad, eficacia y seguridad), lo que garantiza su alta eficiencia. Por esta razón, en la segunda experiencia se tomaron 4 novillos que habían recibido por lo menos 3 vacunaciones contra VFA, que poseían altos títulos de anticuerpos, sometiéndolos a una exposición prolongada y continua con animales que estaban en el período agudo de la enfermedad con virus tipo A (A24 Cruzeiro o A Argentina/2001). De esta manera, los animales fueron desafiados no solo por el contacto estrecho con los virus que estaban eliminando los animales clínicamente enfermos, sino también con el virus que contaminaba el medio ambiente (instalaciones, agua de bebida y alimento). Para los dos subtipos de VFA, los animales expuestos permanecieron asintomáticos, la RT-PCRtr pudo detectar la presencia viral en LEF durante el período de la experiencia (10 días). Como se había determinado en la experiencia anterior y en trabajos previos con desafío con O UKG34/2001 en animales vacunados⁴, los títulos del virus en las muestras de LEF a los 7 días poscontacto fueron inferiores en los animales vacunados comparados con los no vacunados (diferencias significativas, $p < 0,05$) (fig. 3).

Cabe mencionar que los diferentes diseños experimentales de desafío utilizados en este trabajo presentaron perfiles de infección disímiles, lo que sugiere que a campo se podrían presentar múltiples variaciones en las presentaciones de los cuadros infecciosos según el estado inmunitario de los animales, el tipo de virus y la dosis de exposición.

Estos resultados dan muestra de lo complejo que resulta el control y la erradicación de la enfermedad, ya que si bien con la aplicación coordinada de un conjunto de medidas (inmovilización, cuarentena y vacunación de la población susceptible; vigilancia epidemiológica; diagnóstico y eliminación de los animales infectados) el riesgo de difusión de la enfermedad a otras áreas sería mínimo, el retraso en la toma de decisiones y en la aplicación de estas acciones podría permitir el traslado de estos animales infectados a otras áreas, lo que podría causar la expansión del brote.

La aplicación de técnicas validadas, junto con la información generada mediante el uso de diferentes diseños experimentales que simulan la exposición de animales vacunados al VFA, permitió demostrar que la RT-PCRtr no solo tiene valor diagnóstico para confirmar la presencia del VFA, sino que también resulta sumamente valiosa para detectar la infección temprana en los animales expuestos, aun cuando no presenten signos clínicos. De este modo, la RT-PCRtr puede ser utilizada como complemento de otras técnicas diagnósticas, tanto para la investigación de la eficiencia en campañas de control y erradicación como para certificar poblaciones libres de VFA.

Responsabilidades éticas

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Financiación

Este trabajo se realizó con fondos de la PAE-2007-00013 del ANCyT y AESA-201721-PE Fiebre Aftosa de INTA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A la Dra. Soledad García Núñez del Instituto de Biotecnología del INTA-Castelar, por el suministro del plásmido pTOPO-F3B.

Bibliografía

- Alexandersen S, Mowat N. Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;288:9-42.
- Arzt J, Pacheco JM, Rodríguez LL. 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.* 2010;47:1048-63.
- Callahan JD, Brown F, Osorio FA, Sur JH, Kramer E, Long GW, Lubroth J, Ellis SJ, Shoulars KS, Gaffney KL, Rock DL, Nelson WM. 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.* 2002;220:1636-42.
- Cox SJ, Parida S, Voyce C, Reid SM, Hamblin PA, Hutchings G, Paton DJ, Barnett PV. Further evaluation of higher potency vaccines for early protection of cattle against FMDV direct contact challenge. *Vaccine.* 2007;25:7687-95.
- García-Núñez S, Gismondi MI, König G, Berinstein A, Taboga O, Rieder E, Martínez-Salas E, Carrillo E. Enhanced IRES activity by the 3'UTR element determines the virulence of FMDV isolates. *Virology.* 2014;448:303-13.
- Goris N, Vandenbussche F, Herr C, Villers J, Van der Stede Y, De Clercq K. Validation of two real-time RT-PCR methods for foot-and-mouth disease diagnosis: RNA-extraction, matrix effect, uncertainty of measurement and precision. *J Virol Methods.* 2009;160:157-62.
- King DP, Ferris NP, Shaw AE, Reid SM, Hutchings GH, Giuffre AC, Robida JM, Callahan JD, Nelson WM, Beckham TR. Detection of foot-and-mouth disease virus: comparative diagnostic sensitivity of two independent real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *J Vet Diagn Invest.* 2006;18:93-7.
- Kitching RP. Clinical variation in foot and mouth disease: cattle. *Rev Sci Tech.* 2002;21:499-504.
- Kitching RP, Hughes GJ. Clinical variation in foot and mouth disease: sheep and goats. *Rev Sci Tech.* 2002;21:505-12.
- Moonen P, Boonstra J, van der Honing RH, Leendertse CB, Jacobs L, Dekker A. Validation of a LightCycler-based reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods.* 2003;113:35-41.
- National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington, D.C., The National Academy Press; 2011.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. Chapter 2.1.5. Foot and mouth disease. En: OIE, editor. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 7th ed. Paris; 2012. p. 145-73.
- R. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Core Team. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reed M J y Muench H. A simple method for estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 1938;27:493-7.
- Robiolo B, Seki C, Fondevila N, Grigera P, Scodeller E, Periolo O, La Torre J, Mattion N. Analysis of the immune response to FMDV structural and non-structural proteins in cattle in Argentina by the combined use of liquid phase and 3ABC-ELISA tests. *Vaccine.* 2006;24:997-1008.
- Valarcher JF, Leforban Y, Rweyemamu M, Roeder PL, Gerbier G, Mackay DK, Sumption KJ, Paton DJ, Knowles NJ. Incursions of foot-and-mouth disease virus into Europe between 1985 and 2006. *Transbound Emerg Dis.* 2008;55:14-34.
- Zhang ZD, Hutching G, Kitching P, Alexandersen S. The effects of gamma interferon on replication of foot-and-mouth disease virus in persistently infected bovine cells. *Arch Virol.* 2002;147:2157-67.