

PCR dúplex a tiempo real para la detección de la variante clásica (RHDV) y nueva (RHDV2) de la enfermedad hemorrágica del conejo.

Sarto¹, P., Mendoza¹, M., Calvo², A.J., Monroy², F., Jiménez de Bagüés¹, M.P., Calvete¹, C. y Calvo^{1,3}, J.H.

¹Unidad de Tecnología en Producción y sanidad animal, CITA-IA2, Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza. ²TRAGSATEC, Gerencia Sanidad Animal, Seguridad Alimentaria y Salud Pública, Julián Camarillo 6 B, 28037 Madrid. ³ARAID, 50004 Zaragoza. jhcalvo@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La enfermedad hemorrágica (RHD) es uno de los principales factores de mortalidad del conejo silvestre en la península ibérica. Desde su aparición a finales de los años 80 el agente etiológico predominante han sido cepas víricas pertenecientes a un único genogrupo (RHDV). Sin embargo, en 2011 se detectó, inicialmente en el tercio norte de España, una nueva variante vírica (RHDV2) que cursó de forma atípica, modificando la epidemiología de la enfermedad y afectando a animales con menos de 30 días de edad.

Entre los años 2009 y 2016 se ha estudiado la epidemiología de la RHD en cuatro poblaciones experimentales de conejo silvestre mediante captura-recaptura, encontrándose en 2011 el primer aislado de RHDV2 en estas poblaciones (Calvete et al., 2014).

Debido a la necesidad de llevar a cabo un diagnóstico rápido y sensible de las dos variantes y estudiar la epidemiología de la enfermedad antes y después de la aparición del RHDV2, se presenta en este trabajo la puesta a punto de un protocolo que permite identificar los dos genotipos de la enfermedad (RHDV y RHDV2) mediante PCR dúplex a tiempo real (qPCR-dúplex).

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras biológicas fueron obtenidas dentro de un proyecto de colaboración entre TRAGSATEC y el CITA orientado a profundizar en el conocimiento de la epidemiología de la RHD. Entre los años 2009 y 2016 se ha estudiado la epidemiología de la RHD en cuatro poblaciones experimentales de conejo silvestre, en cercados de 1 ha, mediante captura-recaptura. Esta población fue monitorizada con una frecuencia bisemanal, con el objetivo, entre otros, de hallar cadáveres de conejos muertos que fueron llevados al laboratorio para proceder a su necropsia e identificación del virus RHD en tejido hepático. Los diagnósticos de RHD fueron llevados a cabo en base a las lesiones observadas en los cadáveres y a la qPCR-duplex. Además se llevó a cabo un test ELISA directo (Ingezim Rabbit DAS. INGENASA Lab., España) en el hígado. Este test se utilizó para detectar posibles nuevas cepas víricas con nuevas mutaciones en las zonas de unión de sondas y cebadores, y que por lo tanto fallase la qPCR-duplex.

Para la identificación del virus, la extracción del ARN se realizó usando *TRI@REAGENT* (*Sigma Life Science, España*). El ADNc fue obtenido utilizando el kit *SuperScript®III Reverse Transcriptase* (*Invitrogen, España*) y el cebador específico del gen que codifica la proteína de la cápside VP60: 5'-CCAATTGTTACTGGCAGTGGT-3' (Moss et al., 2002). Los cebadores y sondas para la qPCR-dúplex se diseñaron en base a regiones conservadas del gen VP60 tras el alineamiento de secuencias de 524 bp (correspondiendo a los nucleótidos 871-1394 de las secuencias del Genbank acc. nº KY498582 and KY498543 para la RHDV y RHDV2, respectivamente) de aislados de ambas variantes de España, Francia, Italia y Portugal. Con los cebadores utilizados (5'-CAGATTGTTGCCAAGTCCAT-3' y 5'-CGCAACATGATGGGTGTGTT-3') se amplificó un fragmento de 200 pb, utilizando sondas específicas "molecular beacon" para cada variante (FAM-5'-CGCGATCCCAGACAGAATTGTGACCACGATCGCG-3'-BHQ1 y CGCGATCGGGTTGTTTGTGATGGCAGATCGCG-3'-BHQ1 para las variantes RHDV y RHDV2, respectivamente), diseñadas por Mycrosynth (Mycrosynth, Suiza). La qPCR-dúplex se llevó a cabo en una plataforma ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, España). La amplificación se realizó en un volumen final de 10 µl conteniendo 5µl de Premix Ex Taq (2x) master mix (Takara, Japón), 0,1 µl de Rox ref dye II, 0,2 y 0,4 µM de cada cebador y sonda, respectivamente, 3,1µl de agua ultrapura, y 1 µl de ADNc (500ng). Las condiciones de amplificación incluyeron un ciclo a 95°C durante 30s para desnaturalizar el ADN y 50 ciclos de amplificación (95°C durante 5s y 59°C durante 34s). La especificidad de la qPCR-dúplex fue evaluada mediante el genotipado de los aislados procedentes de conejos muertos

encontrados en los cercados con lesiones características de la enfermedad (n=221) y muestras de conejos domésticos sanos (n=25) que fueron usados como control negativo. Además, 99 muestras fueron secuenciadas para genotipar los aislados (RHDV o RHDV2): 61 muestras fueron secuenciadas para la secuencia completa del gen VP60 (1740 pb) y 38 para un fragmento de 524 bp. La identidad de la variante aislada se confirmó mediante estudios de homología con las secuencias del GenBank a través de la aplicación BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Se utilizaron curvas estándar con diluciones seriadas 1:10 (con rangos entre 1 y 10⁻⁶) para determinar la eficiencia de la amplificación de cada variante. Para ello se realizaron dos mezclas independientes de ADNc procedentes de 5 animales muertos en fase aguda de la enfermedad para RHDV o RHDV2. La muestra sin diluir (500ng de ADNc de RHDV o RHDV2) y sus diluciones seriadas fueron amplificadas por triplicado en el mismo experimento. Las condiciones utilizadas fueron las descritas para la qPCR-dúplex. La eficiencia de la qPCR-dúplex para cada genotipo se calculó con la ecuación $E=10^{-1/\text{pendiente}}$. Los valores Cq medios, desviaciones estándar (DE) y % del coeficiente de variación (%CV) fueron obtenidos mediante la realización de tres experimentos diferentes realizados en tres días diferentes, y calculados independientemente para cada dilución de ADNc. Finalmente, se utilizó el ELISA directo para comparar sus resultados con la qPCR-dúplex.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha puesto a punto una qPCR-dúplex rápida, sensible y específica que es capaz de detectar las dos variantes de la enfermedad RHD de manera simultánea. La qPCR-dúplex fue estandarizada mediante curvas estándar. La robustez del método se evidenció por la consistencia de los datos obtenidos de los tres análisis de regresión independientes que se llevaron a cabo. Las eficiencias variaron entre 2,01-2,04 y 1,96-1,98 para las variantes RHDV y RHDV2, respectivamente, con una correlación de 0,99 para ambas, lo que demostró la buena linealidad de la curva estándar. Los valores medios de Cq variaron entre 16,84-16,98 (con un % del CV entre 0,36 y 0,91) para muestras sin diluir de ADNc y 38,23-39,91 (con un % del CV entre 0,57 y 1,11) en la dilución 10⁻⁶ para la variante RHDV. Similares resultados fueron encontrados para la variante RHDV2 con unos valores medios de Cq que oscilaron entre 18,03-18,30 (con un % del CV entre 0,70 y 0,77) para ADNc sin diluir y 38,14-39,21 (con un % del CV entre 0,98 y 0,66) en la dilución 10⁻⁶. Los valores Cq medios, desviaciones estándar (DE) y % del coeficiente de variación (%CV) mostraron muy poca variación para ambos genotipos indicando una alta repetibilidad del método (Tabla 1). El rango de amplificación encontrado para la variante RHDV fue mayor que el descrito por Benevides et al. (2015) quienes encontraron unos valores medios de Cq que variaron entre 14,34 en muestras sin diluir (animales muertos en fase aguda de la enfermedad) y 31,67 en una dilución 10⁻⁵. Por el contrario, Dias-Duarte et al. (2015) encontraron un menor límite de detección, en una dilución 10⁻¹¹, con valores de Cq que oscilaron entre 10,24 en una dilución 10⁻² y 37,56 en una dilución 10⁻¹¹ para la variante RHDV2. Sin embargo, estos autores estandarizaron su método mediante diluciones seriadas de transcritos de ARN obtenidos *in vitro* de plásmidos recombinantes que contenían el fragmento de interés del genotipo RHDV2. Comparativamente, nuestros valores de Cq en muestras obtenidas de animales muertos en fase aguda de la infección (16,91 y 18,23 para la RHDV y RHDV2, respectivamente) son un poco menores a los descritos por Benevides et al. (2015) (14,34 para RHDV) y Dias-Duarte et al. (2015) (15,7 para RHDV2).

Las 221 muestras analizadas en este estudio y procedentes de conejos muertos encontrados en los cercados con lesiones características de la enfermedad fueron positivas a RHDV o RHDV2 mediante qPCR-dúplex, mientras que las muestras procedentes de conejos sanos resultaron negativas. Las secuencias de unión de los cebadores y sondas en el gen VP60 estuvieron conservadas en todas las muestras analizadas, presentando un 100% de sensibilidad y especificidad, ya que todas las muestras fueron correctamente genotipadas como RHDV (n=18) o RHDV2 (n=81) por la qPCR-dúplex de acuerdo con los datos obtenidos de secuenciación. La sensibilidad y especificidad del ELISA directo comparado con la qPCR-dúplex fue menor (Tabla 2). Por este motivo, podría ser recomendable el uso de esta qPCR-dúplex en lugar del ELISA directo en las campañas de vigilancia de la enfermedad, especialmente en las granjas de conejo doméstico donde

podrían estar circulando ambas variantes. Sin embargo, es remarcable que estos virus tienden a acumular mutaciones en su proceso de evolución, y por lo tanto sería recomendable la secuenciación de nuevos aislados que puedan ir apareciendo para detectar posibles nuevas mutaciones que pudieran afectar a los sitios de unión de cebadores y sondas que podrían producir la aparición de falsos negativos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Benevides et al. 2015. Rev. Port. Ciências Veterinárias 110: 79-85. • Calvete et al. 2014. World Rabbit Sci. 22: 91. • Dias-Duarte et al. 2015. J. Virol. Methods 219: 90-95. • Moss et al. 2002. J. Gen. Virol. 83: 2461-2467.

Agradecimientos: Estos resultados derivan del desarrollo de los proyectos de I+D “INMUNE 8011” e “INMUNIZADOS 1316” realizados en el marco de un convenio de colaboración entre el CITA y TRAGSATEC, así como del proyecto E-RTA2014-00009-00-00 del INIA.

Tabla 1. Variabilidad de la qPCR-dúplex en tres experimentos independientes. Se muestra el rango (valores mínimos y máximos) para cada parámetro. DE: Desviación estándar; % CV: Porcentaje del coeficiente de variación

Dilución	Genotipo					
	RHDV			RHDV2		
	Cq	DE	%CV	Cq	DE	%CV
1	16,84-16,98	0,06-0,15	0,36-0,91	18,03-18,31	0,13-0,14	0,71-0,77
10 ⁻¹	18,42-18,84	0,32-0,35	1,73-1,89	20,45-20,83	0,07-0,20	0,46-1,00
10 ⁻²	21,27-21,28	0,16-0,39	0,76-1,82	23,46-23,89	0,19-0,34	0,81-1,43
10 ⁻³	24,68-24,97	0,25-0,36	1,03-1,44	26,88-27,57	0,04-0,20	0,14-0,74
10 ⁻⁴	28,19-29,32	0,11-0,35	0,40-1,18	30,58-31,22	0,22-0,38	0,72-1,21
10 ⁻⁵	32,08-32,30	0,09-0,37	0,28-1,17	34,01-34,99	0,08-0,18	0,23-0,54
10 ⁻⁶	38,23-38,91	0,21-0,40	0,57-1,11	38,14-39,21	0,26-0,38	0,66-0,99

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad del ELISA directo comparado con la qPCR-dúplex

ELISA	qPCR-dúplex	
	RHDV	RHDV2
Positivo	23 (45,01%)	133 (78,2%)
Negativo	28 (54,99%)	37 (21,8%)

DUPLEX REAL TIME PCR DETECTION OF RABBIT HAEMORRHAGIC DISEASE VIRUS GENOTYPES RHDV AND RHDV2.

ABSTRACT: We have developed a rapid, sensitive and specific duplex-qPCR for detection of RHDV and RHDV2 genotypes of the rabbit haemorrhagic disease (RHD) in the same assay. The primers and probes target sequences are conserved in all samples analysed showing 100% sensitivity and specificity, being all RHDV or RHDV2 isolates correctly genotyped by duplex-qPCR according to their sequence data. Standardisation was performed using standard curves. Efficiencies ranged from 2.01-2.04 and 1.96-1.98 for the RHDV and RHDV2 genotypes, respectively, and correlation of 0.99 for both genotypes reflecting a good linearity of the standard curve. High repeatability and reproducibility of the assay was found with very low variation, with CV lower than 1.89 and 1.21% for RHDV and RHDV2, respectively. The sensitivity of detection was higher for the duplex-qPCR assay than a direct ELISA assay.

Keywords: Rabbit haemorrhagic disease, Lagovirus, RHDV2, qPCR.