

## PUESTA A PUNTO DE UNA PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE SENECAVIRUS A

Franco L<sup>1</sup>, Ruiz V<sup>1,2</sup>, Alvarez I<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Virus Adventicios, Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT), INTA-CONICET, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>CONICET, Argentina.

franco.lautaro@inta.gob.ar

### INTRODUCCIÓN

#### Senecavirus A (SVA)

- Familia: *Picornaviridae*
- Única especie del género *Senecavirus*
- No-envuelto
- ARN + monocatenario
- La **Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)** lo considera de gran importancia debido a que sus signos clínicos son indistinguibles de las enfermedades vesiculares porcinas: **Virus de la fiebre aftosa (FMDV)**, **Virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV)**, **Virus de la estomatitis vesicular (VSV)** y **Virus del exantema vesicular porcino**.
- Ha sido encontrado como **agente contaminante** en tripsina porcina y en suero, por lo que todos los productos biológicos que usen en sus procesos de producción ingredientes de origen animal derivados de porcinos deben asegurar que los mismos se encuentran libres de SVA.



Control de SVA por PCR en tiempo real (RT-qPCR) es un requerimiento de APHIS-USDA



Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal

### OBJETIVO

Puesta a punto de una RT-qPCR para la detección de Senecavirus A en muestras y productos biológicos.

### MATERIALES Y MÉTODOS

- Se siguió el protocolo desarrollado por el Centro de Biológicos Veterinarios del APHIS-USDA y por PANFTOSA-FAO.
- Se utilizaron los cebadores SVV3D-F y SVV3D-R que amplifican un fragmento de 78pb del gen de la polimerasa viral (3D) y la sonda SVV3D-P.
- Plásmido control pSVV3D → Curva estándar con diluciones de  $1 \times 10^7$  -  $1 \times 10^{-2}$  copias/ $\mu$ l
- **Control negativo (-):** ARN de cultivo celular PK15
- **Control positivo (+):** ARN de Senecavirus A (Trizol donado por PANFTOSA-FAO)
- **Control positivo débil:** Dilución  $1 \times 10^2$  del plásmido pSVV3D
- **Curva estándar, muestras y controles:** Por duplicado en cada ensayo

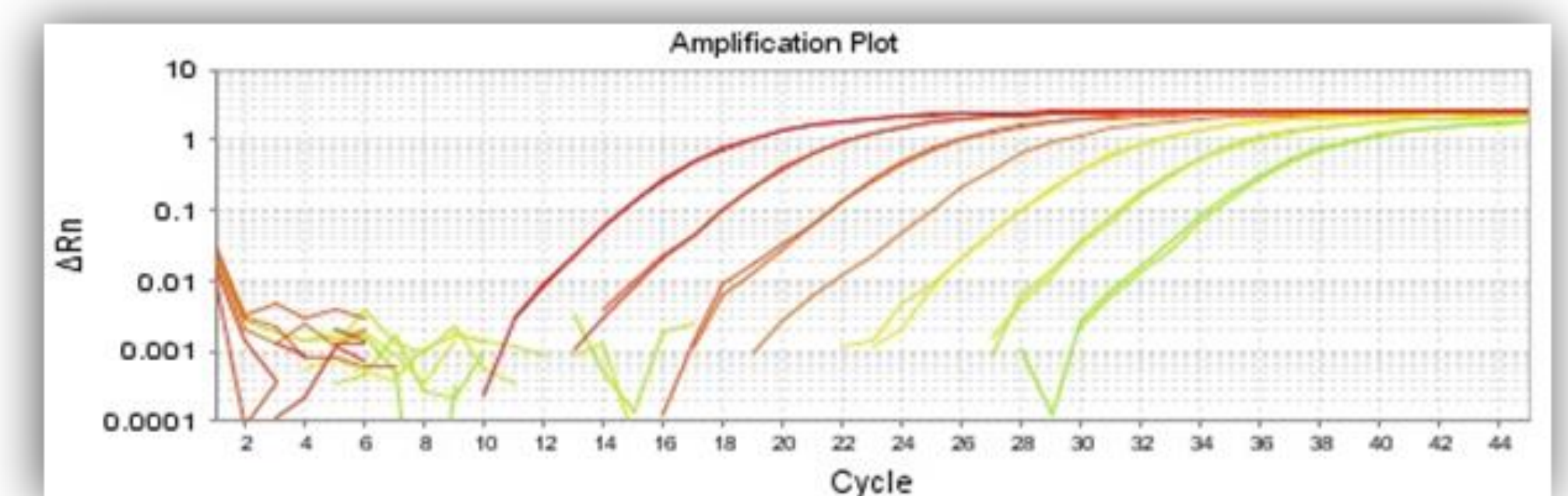
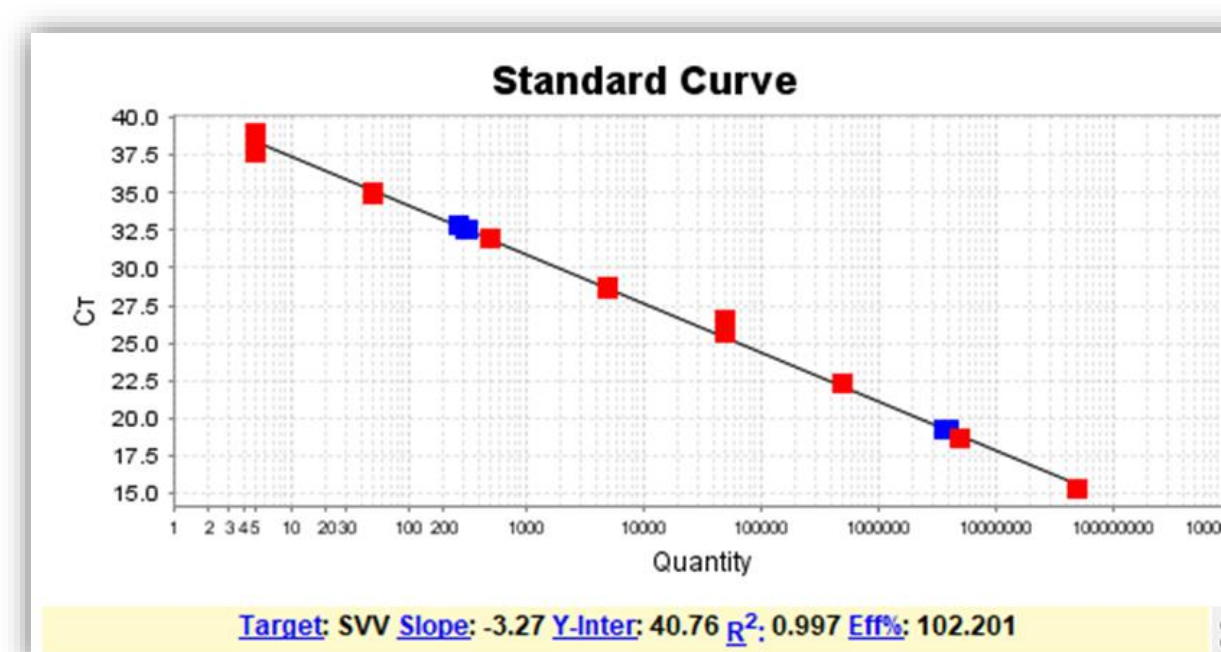
### RESULTADOS

- **Especificidad de los cebadores: PCR punto final**



- **RT-qPCR: Valores de Ct de la curva estándar (7 ensayos independientes)**

- ✓ Linealidad ( $R^2$ ) = **0.995**
- ✓ Eficiencia (pendiente) = **102%**
- ✓ Rango dinámico:  **$1 \times 10^0$  -  $1 \times 10^7$  copias/ $\mu$ l**
- ✓ Sensibilidad: **50 copias/reacción (1x100 copias/ $\mu$ l)**
- ✓ Reproducibilidad (variabilidad de Ct de curva estándar): **CV entre 0,4 - 1,9%**



- Análisis de 13 muestras de origen porcino: **No se detectó SVA**
- Simulación de muestras contaminando lisado de células PK15 con diluciones conocidas de plásmido: **100% de detección**
- Especificidad (Parvovirus porcino – Reovirus): **100%**

### CONCLUSIÓN

- Se han logrado avances en la puesta a punto de un ensayo de RT-qPCR sensible y específico para la detección del genoma de SVA en muestras y productos biológicos.
- Este ensayo permitirá declarar como libre de SVA a los productos biológicos derivados de porcinos analizados en nuestro país y contar con una nueva herramienta diagnóstica diferencial de enfermedades vesiculares en porcinos, de gran utilidad para tomar medidas de control en caso de ser necesario.