

## **RT-PCR-ANIDADO PARA EL DIAGNOSTICO DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO DEL CERDO (PRRS)**

Carreón NR<sup>1</sup>, Cortes FR<sup>2</sup>, Trujillo OME<sup>1</sup>, Doporto DJM<sup>1</sup>, Becerra A<sup>3</sup>, Sánchez BJI<sup>1</sup> y Alonso MR<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Producción Animal: Cerdos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F.

<sup>2</sup>Departamento de Genética.

<sup>3</sup>Multiplicadora PROAN, San Juan de los Lagos, Jal.

Correspondencia con el autor: rcn@correo.unam.mx

### **Introducción.**

Desde la aparición de la enfermedad de PRRS, una de las principales necesidades aparte de su control, ha sido la detección precisa y oportuna del agente que la ocasiona. Sin embargo el aislamiento viral tiene muchas dificultades, por lo que la amplificación de segmentos genómicos específicos virales a partir de tejidos y fluidos infectados, ha representado una opción muy importante en el diagnóstico de PRRS. Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer la técnica de Transcripción Reversa en Cadena de la Polimerasa anidada (RT-PCR-a) para el diagnóstico de la enfermedad de PRRS utilizando los ORF 5 y 7 debido a que comunmente se amplifica uno u otro.

### **Material y Métodos.**

Se empleo una vacuna comercial para usarla como un control positivo para el desarrollo de la prueba. Por otro lado, se utilizaron tejidos (bazo, ganglio, pulmón y tonsiia) a partir de 5 casos de campo, asimismo se emplearon 10 mezclas de entre 10 a 20 sueros de animales con signología clínica sugestiva a PRRS. La metodología se desarrollo en 3 fases. En primer lugar se realizo la extracción del RNA mediante el uso de trizol. La segunda fase consistió en realizar la RT-PCR para obtener el DNA complementario, para el desarrollo de esta prueba, se diseñaron en base a la secuencia del virus, dos oligonucleótidos uno para el ORF 5 y otro para el ORF 7. La tercera fase fue estandarizar la técnica de PCR anidado la cual consistió en una segunda amplificación empleando iniciadores internos al producto amplificado, correspondientes a cada uno de los ORFs mencionados. Para verificar la presencia de los fragmentos esperados, se prepararon geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

### **Resultados**

Los resultados obtenidos fue que en todos los casos se observó que en la primera amplificación no se detecto ningún fragmento correspondiente a los ORFs mencionados, sin embargo en la segunda reacción de amplificación se encontraron los productos esperados. (Figura 1)

Por otro lado aunque en todos los tejidos se detectó amplificación, en tonsila y ganglios linfáticos, los productos amplificados fueron más evidentes. En el caso de las mezclas de sueros, los fragmentos amplificados pudieron observarse sin ningún problema.



**Figura 1.** Reamplificación ORF 5N  
M. Marcador de peso molecular  
1 al 8 muestras de campo

### **Discusión y Conclusión**

Con base a los resultados anteriores, la técnica de RT-PCR-anidada, es una alternativa al diagnóstico virológico de PRRS y es preferible utilizar esta, en vez de un PCR simple debido a que con este último podrían obtenerse resultados falsos negativos. Este método representa varias ventajas como es el tiempo en obtener el resultado que puede ser hasta en un día, así como el hecho de que es específico y sensible. Otra ventaja importante es que se pueden detectar individuos positivos tempranamente y se pueden identificar las diferentes cepas virales que participan en la enfermedad, por lo que se concluye que es una herramienta diagnóstica confiable para el diagnóstico de PRRS.

### **Implicaciones**

El desarrollo de este PCR anidado conlleva a contar con una prueba confiable para el diagnóstico de PRRS y poderla utilizar en programas de control y/o erradicación.