

## DETERMINACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS AL VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO DEL CERDO (PRRS) CON LA TÉCNICA DE RT-PCR.

\*Sotomayor, A.<sup>1</sup>, Sánchez, JI.<sup>1</sup>, Trujillo, ME.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>FMVZ -UNAM, C.U., Méx D.F. \*langosta13@hotmail.com

### Introducción

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRS *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) se considera una de las enfermedades más importantes que afectan a la industria porcina. El virus de PRRS tiene 8 marcos de lectura abiertos. El ORF 5 codifica para la proteína de la envoltura GP5 y es el más variable, por la cual se utiliza para identificar aislamientos genéticamente distintos. El ORF 7 que codifica para la proteína N es más conservado. El presente estudio se basa en el correcto diseño de iniciadores específicos para las cepas americana y europea del virus de PRRS y para los dos ORFs comúnmente estudiados (ORF5 y ORF7) para detectar muestras positivas al virus de PRRS provenientes de diferentes estados de la República Mexicana.

### Material y Métodos

Los iniciadores se diseñaron en el programa ClonManager Versión 7.0, al alinearlos con más de 200 secuencias de diferentes partes del mundo; se evaluaron en el programa PRIMER y se usó el programa Basic Local Alignment Sequence Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para validar su especificidad. Las muestras fueron obtenidas en rastros y granjas de varios estados de la República Mexicana. Los animales muestreados fueron aquellos que presentaban sinología respiratoria y lesiones visibles en pulmón. Las muestras utilizadas fueron: pulmón, linfonodo, traquea, cornete nasal, hisopo nasal y semen. El procedimiento de extracción de RNA se llevó a cabo por el método de fenol (Gibco Life Technologies 1996) y la técnica de RT-PCR se realizó con el kit RT-PCR One Step Invitrogen® utilizando las siguientes condiciones: Un ciclo de 50 °C durante 30 minutos, un ciclo de 95° por 15 minutos, 40 ciclos: 94 °C durante 30 segundos, 54°C (ORF 5) o 58°C (ORF 7) durante 60 segundos y 72 °C durante 60 segundos; un ciclo final de 72 °C durante 10 minutos y se mantiene a 4° C hasta que se utiliza el producto en un gel de agarosa al 2% para correr con electroforesis horizontal y visualizar los amplicones obtenidos.

### Resultados

Se procesó un total de 119 muestras provenientes de 14 estados de la República Mexicana de granjas positivas a PRRS, en algunos casos formando pools de RNA que incluía hasta 5 muestras. El 68.12% de las muestras fueron positivas; los iniciadores que detectaron mayor cantidad de muestras positivas fueron los diseñados para el ORF 7 (49.27%) seguidos por los diseñados

para ORF 5 con un protocolo de PCR anidado (40.57%) y finalmente el ORF 5 simple (5.80%). En nuestro estudio no se identificó ninguna muestra positiva hacia el virus europeo.

### Discusión

La RT PCR dirigida al ORF7 fue la que obtuvo mayor cantidad de muestras positivas sin embargo, no todas las muestras detectadas como positivas con los iniciadores para la RT PCR anidada del ORF5 fueron amplificadas con los oligonucleótidos diseñados para ORF7 lo cual confirma la variación genética dentro del gen ORF7. Al utilizar éstos iniciadores, el amplicón que más se obtuvo fue igual en peso al de la vacuna, sin embargo, hay muestras que presentan amplicones con diferentes pesos moleculares (Figura 1) lo cual sugiere posibles variaciones genéticas. Entre los resultados obtenidos se encuentran tres tamaños de amplicones que son los más comunes (380 pb, 330 pb y 400 pb) indicando la presencia de tres variantes genéticas virales.

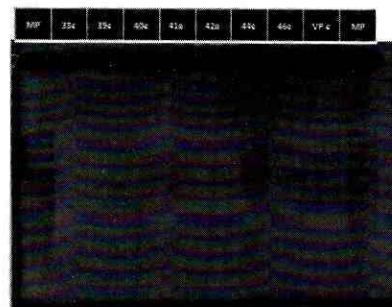


Figura 1. Amplicones de diferente tamaño con los iniciadores para ORF7. MP: marcador de peso molecular, VP: vacuna de PRRS, 38e-46e muestras.

Por otra parte se encontró que las muestras de hisopo nasal fueron 100% positivas lo cual facilitaría la toma de muestras para el estudio de la presencia del virus en granjas.

### Conclusiones

Con estos resultados podemos concluir que el diagnóstico debería estar dirigido al ORF 7 o incluso al uso complementario de los iniciadores; y que en México la circulación de diferentes cepas se está evidenciando.

### Bibliografía

1. Sotomayor, G.A. (2011) Tesis Licenciatura. FMVZ-UNAM.
2. Zimmerman J. The PRRS Compendium (second ed.) 2003; 1-6.
3. Meng, XJ. *Vet Micro* 2000; 74:309-329.