

ESTUDIO COMPARATIVO DEL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL PRRS POR RT-PCR, PCR ANIDADA Y RT-PCR EN TIEMPO REAL

Uribe VZA^{1*}, Gayosso VA¹ y Alonso RA¹.

¹FMVZ-UNAM-Genética Molecular.

zoalli@hotmail.com

Introducción

El virus del Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (PRRSV) es una enfermedad infecciosa, causada por un virus ARN de la familia Arteriviridae género Arterivirus. Afecta a todas las etapas de la producción de cerdo provocando daños reproductivos y síntomas respiratorios.¹ Debido a la alta prevalencia, propagación y pérdidas económicas que genera el PRRSV en la porcicultura nacional, es necesario disponer de un diagnóstico temprano, preciso y oportuno. En los últimos años las técnicas moleculares han acelerado el diagnóstico a través de la detección de material genético de los patógenos, por poseer gran especificidad, sensibilidad y rapidez.² Por ello el objetivo de este trabajo fue el estudio comparativo de los métodos de diagnóstico molecular RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR en cuanto a especificidad, sensibilidad, tiempo de desarrollo de las pruebas y costos de los consumibles.

Material y métodos

Se definieron los iniciadores para amplificar segmentos diagnósticos del virus del PRRS para las diferentes técnicas. Para la RT-PCR y PCR anidada, se evaluó el gen completo de ORF5 cuyos iniciadores amplifican 793pb y 740pb respectivamente, y el ORF7 que genera un amplicón de 557pb para la RT-PCR y de 370pb para la PCR anidada. Por RT-PCR-TR se seleccionó un segmento de la región UTR3' que amplifica 114pb. Para contar con un control estándar de cuantificación este fragmento clono en el vector plasmídico comercial (pTZ57R/T Fermentas®). El ADN plasmídico recombinante denominado pPZ6, fue purificado por el kit comercial Zippy™ Plasmid Maxiprep (bajo las condiciones del fabricante). Una vez obtenido el ADN del plásmido se cuantificó por fluorometría en el termociclador Rotor-Gene 6000 con el colorante de PicoGreen®. Para estandarizar la curva de cuantificación utilizando el ADN del plásmido pPZ6, se realizaron diluciones decuples seriadas de 1 a 1×10^{-8} ng y se obtuvo el número de moléculas presentes en las diferentes cantidades del plásmido pPZ6. El ensayo fue realizado por triplicado en 8 experimentos independientes. Con base a los resultados se determinó el rango dinámico óptimo para la cuantificación del virus del PRRS por RT-PCR-TR. El ARN viral con el que se validó y determinó la sensibilidad, así como la repetibilidad de los ensayos de RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR fue obtenido de la vacuna Ingelvac® PRRS MLV, con un título de $5 \times 10^{4.9}$ virus en 20ml. El ARN se extrajo por la técnica de fenol ácido y posteriormente se realizaron 8 diluciones decuples seriadas partiendo de 1:10 y estimando el número de partículas virales presentes en cada dilución. Para la RT-PCR-TR las determinaciones se realizaron por triplicado y en cuatro experimentos independientes; también se incorporó un control positivo interno que

valida la reacción de PCR y puede descartar reacciones falsas negativas; para esto se empleó un plásmido que contiene un segmento del gen de la proteína M del virus de influenza aviar, junto con los iniciadores y sonda específica. En el caso de los ensayos de RT-PCR se efectuaron en dos pasos; en el caso de la PCR anidada se tomaron 2ul de la primer PCR. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (0.5ug/ml). Estos ensayos se hicieron en cuatro ocasiones para estimar la repetibilidad. Aunado a esto se hizo un estudio de costos basado en los consumibles y reactivos necesarios, así como un comparativo en cuanto al tiempo que se requiere para realizar cada una de las pruebas de RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR para el diagnóstico del PRRSV.

Resultados

Al estandarizar la curva de cuantificación del plásmido pPZ6 por la técnica de RT-PCR-TR, el límite de sensibilidad alcanzado fue de 4×10^3 moléculas y evaluando las diluciones del ARN viral se detectaron 50 unidades virales. Para los ensayos de RT-PCR y PCR anidada, evaluando el ORF5 la sensibilidad fue de 5×10^3 unidades virales y 5 unidades virales, respectivamente. La amplificación del ORF7 tuvo una sensibilidad de 5×10^2 unidades virales para la RT-PCR y 0.5 unidades virales para la PCR anidada. En el estudio de costos basado en los consumibles y reactivos, el costo por reacción para la RT-PCR-TR, RT-PCR y PCR anidada es de \$9.73, \$16.93 y \$22.04 respectivamente. Los gastos generados para la construcción del control positivo de cuantificación pPZ6 fueron de \$918.54. Para el diagnóstico cuantitativo por RT-PCR-TR el costo es de \$141.44 por muestra y el no cuantitativo es de \$68.68, éste último precio muy parecido al obtenido para del diagnóstico por RT-PCR y PCR anidada que es de \$66.99 y \$71.74. El tiempo para realizar un diagnóstico por RT-PCR y PCR anidada es mínimo de 9 horas e incluye procesos post PCR, contra 5 horas que requiere el ensayo de RT-PCR-TR.

Discusión

La región UTR3' así como el fragmento del gen ORF 7 son regiones altamente conservadas en la mayoría de los aislados, mientras que el ORF5 puede no ser amplificado, sin embargo este gen es útil para determinar la diversidad genética de las cepas.³ Los ensayos de validación del control positivo de cuantificación pPZ6 arrojaron una R^2 promedio de 0.99, indicando una buena linealidad y constancia de los resultados. Se conocen diversos factores que pueden alterar los resultados en cuanto a la sensibilidad mostrada por los ensayos de RT-PCR-TR, RT-PCR y PCR anidada, algunas son la integridad del material genético empleado, así como la eficiencia de la purificación o la presencia de inhibidores en la muestra.⁴

Aunado a esto se ha documentado que la sensibilidad de las técnicas depende si se realizan en uno o dos pasos, es decir si se efectúa la transcripción reversa y la PCR en un tubo de reacción, o si se realizan por separado. En este proyecto los ensayos en dos pasos mostraron mayor sensibilidad, pero incrementan el tiempo para el análisis de las muestras. En lo que a consumibles utilizados se refiere la RT-PCR-TR requiere de \$9.73 por reacción y se realiza el ensayo en un lapso de 2 horas 30 minutos, en caso de necesitar un diagnóstico cuantitativo, ésta es la prueba más costosa y es de \$141.44; de no ser necesaria la cuantificación el costo es de \$68.68 por muestra y ambas se obtienen en 5 horas. En México existe un kit comercial importado para PRRSV por tiempo real con 96 reacciones; el costo promedio por reacción es de \$247.91 y el tiempo de entrega es de 30 a 45 días, siendo el tiempo para obtener resultados de 5 horas. Aunque la PCR anidada, mostró una mayor sensibilidad el costos de los consumibles es mayor, siendo de \$23.00 por reacción en un lapso de casi 6 horas; mientras que los costos reales para obtener un diagnóstico ascienden a \$66.99 para la RT-PCR y \$77.21 para la PCR anidada por muestra, en un tiempo estimado de 9 horas.

Conclusiones

Se desarrolló un ensayo de RT-PCR-TR para el diagnóstico y cuantificación del virus de PRRS construyendo un control estándar de cuantificación (pPZ6). Se comparó la RT-PCR, PCR anidada y la RT-PCR-TR en los niveles de sensibilidad y repetibilidad donde la PCR anidada mostró la sensibilidad más alta, seguida de la RT-PCR-TR y por último la RT-PCR. De igual forma se evaluaron los costos generados para el diagnóstico del PRRS, la pruebas la más económica fue RT-PCR, seguida de la RT-PCR-TR y por último la PCR anidada.

Se encontró que el método de RT-PCR en TR es el sistema más rápido y económico aunque un poco menos sensible que el RT-PCR anidada. Sin embargo este último es más propenso a resultados falsos positivos.

El empleo de la RT-PCR-TR es apropiada para tamizados o diagnóstico molecular a gran escala, en donde se requiere evaluar un gran número de muestras. La RT-PCR-TR cuantitativa puede aplicarse en la determinación de la carga viral en pacientes, en vacunas o para la titulación de cultivos virales.

Igualmente, la RT-PCR-TR es apropiada en investigación en experimentos de inmunización–desafío, donde se requiere evaluar si el virus se está propagando en tejidos.

Si se desea recuperar el producto de amplificación para caracterizar la cepa viral por secuenciación o por RFLP, con fines de epidemiología molecular, el método más eficiente es la RT-PCR anidado en dos pasos.

Referencias bibliográficas

¹ Cho JG, Dee SA. (2006). *Theriogenology*, 66 (8) 655-662.

² Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. (1996) 6 (10): 986-994.

³ Yin Y., Changlong P., Huochun L., Zuzhang Y., Jiaqi Lu., et al. (2013). *Arch Virol*, 158 (13): 1719-1732.

⁴ Fleige S., Ptaffl M. *Molecular Aspects of Medicine* (2006). 27 (13): 126-139