

APLICACIÓN DE LA RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE PRRS

Ana Rubio García, Víctor Rodríguez Prieto, Deborah Kukielka Zunzunegui.

Tutores: José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez y Deborah Kukielka Zunzunegui

Dpto. de Sanidad Animal. Fac. de Veterinaria. UCM

RESUMEN

El PRRS es una de las enfermedades infecciosas más importantes por el impacto económico que supone para la industria porcina nacional e internacional.

Va a estar producida por un virus ARN cuyas principales características son la variabilidad genética y antigénica, sus propiedades inmunomoduladoras y su capacidad para inducir infecciones persistentes. Hasta el momento se han reconocido dos genotipos principales del virus de PRRS, el europeo (EU) y el americano (NA). La comparación de sus secuencias ha mostrado diferencias genéticas significativas entre ellos, lo que contribuye a que la vacunación sea poco efectiva. Uno de los métodos más empleados para el diagnóstico de PRRS es la RT-PCR que, acompañada de secuenciación, nos permite determinar el genotipo viral. En los últimos años se han empezado a desarrollar nuevas técnicas de RT-PCR en tiempo real que suponen una mejora sobre las convencionales debido a que presentan ventajas como su mayor sensibilidad, la posibilidad de cuantificar la carga viral o el ahorro de tiempo y material, mejorando el control de la enfermedad.

En este trabajo queremos hacer patentes las ventajas y aplicaciones de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico y el control del virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino.

ABSTRACT

PRRS is one of the most important infectious diseases in swine national and international industry because of its economic impact.

It is caused by a single stranded RNA virus which its main characteristics are: genetic and antigenic variability, immune modulation properties and its capacity to produce persistent infections.

Up to now, there are two main genotypes, the North American (NA) and the European (EU). The comparison of its sequences has shown important genetic differences between them, what contributes to the failure of the existing vaccines against it. One of the most used diagnostic methods is the RT-PCR which complemented with sequencing, leads to determinate the viral genotype. In the last years, new RT-PCRs in real time have been developed because they present advantages as higher sensitivity, quantification of viral load or saving on material and time, improving the control of the disease.

In this job, we would like to show the advantages and applications of the real time RT-PCR for the diagnostic and control of the PRRS virus.

Palabras clave: RT-PCR, PRRS, diagnostico.

INTRODUCCIÓN

El PRRS (Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino) es una de las enfermedades infecciosas más importantes por el impacto económico que supone para la industria porcina nacional e internacional (Albina, 1997).

Producida por un virus ARN monocatenario de polaridad + del orden *Nidovirales*, familia *Arteriviridae* género *Arterivirus*, cuyas principales características son su enorme variabilidad genética y antigénica, sus propiedades inmunomoduladoras y su capacidad para inducir infecciones persistentes.

Existen dos grupos principales: el americano (NA) y el europeo (EU), y entre ellos la variabilidad genética puede llegar a ser hasta del 78 por ciento (incluso en una misma cepa encontramos diferencias significativas) (Allende. R, 1999). Debido a esto, es necesaria la utilización de técnicas moleculares para el diagnóstico. (Andreyev, V. 1997)

El genoma viral presenta siete marcos de lectura abierta u ORFs: el primero codifica para la polimerasa, del segundo al sexto para las proteínas de la envuelta, y el ORF 7 para las proteínas de la nucleocápside, siendo el más conservado y por tanto el que permite detectar la mayoría de las cepas.(Nelsen CJ *et al* , 1999)

El virus es capaz de producir grandes trastornos en la granja, ya que afecta tanto a los reproductores como a los lechones, así como a los animales de cebo. Es decir, afecta a todo el ciclo productivo existiendo síntomas reproductivos y síntomas respiratorios.

Los síntomas que se observan en los adultos reproductores son: cianosis en orejas, vulva y cola en hembras, y disminución de la libido y la calidad del eyaculado en machos. En los lechones se observa una disminución de la tasa de crecimiento, debilidad, hemorragias, falta de coordinación y temblores musculares. Los síntomas respiratorios que presentan los animales en cebo consisten en tos, estornudo, disnea, taquipnea, descargas muconasales, fiebre, letargia, neumonía, etc. Otra de las características de este agente es su capacidad de inmunosupresión en el hospedador, por lo que aparecen infecciones secundarias (p.ej. micoplasmosis). (Hall W, 2005)

En este trabajo queremos presentar una técnica diagnóstica de RT-PCR en tiempo real basada en SYBR-GREEN para la detección de vPRRS (virus de PRRS) en suero y sus aplicaciones para realizar una mejora en el control de esta enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para poner a punto la técnica de RT-PCR se emplearon controles positivos de virus purificado. Una vez se comprobó que la técnica tenía una sensibilidad y especificidad adecuadas, se pasó a probarla con muestras de campo. Se obtuvieron 20 muestras procedentes de una explotación de Navarra que presentaba en sus animales de cebo síntomas respiratorios, sospechando una infección por PRRS.

El SYBR-GREEN es el fluoróforo específico de ADN bicatenario más usado en la RT-PCR, ya que es económicamente más competitivo que otras sondas y permite cuantificar. Este formato de detección necesita una puesta a punto previa para que la PCR no amplifique productos inespecíficos que luego la molécula detectaría, introduciendo errores en el posterior análisis de los resultados.

La interpretación se realiza mediante la curva de amplificación y la curva de disociación obtenidas.

2.1- *Diseño de primers:*

Mediante el diseño de un cebador forward y un cebador reverse, se consigue la amplificación de un fragmento del ORF 7 del genoma viral de 286 pares de bases. Se eligió el ORF 7 porque es la región mas conservada del genoma viral.

2.2- *Extracción del ARN y RT-PCR convencional:*

La extracción se llevó a cabo con el kit NucleoSpin® basado en la extracción de ARN por columnas de sílice, siguiendo las instrucciones del proveedor.

La RT-PCR convencional fue utilizada como técnica de referencia durante el proceso de puesta a punto de la RT-PCR en tiempo real, siguiendo el protocolo descrito en el artículo de Donadeu M. et al “Using polymerase chain reaction to obtain PRRSv-free piglets from endemically infected herds” (*Swine Health Prod.* 1999).

2.3- *RT-PCR en tiempo real basada en SYBR GREEN:*

Se desarrolló una RT-PCR en tiempo real en un paso basada en SYBR-GREEN. Todas las reacciones se llevaron a cabo en Stratagene MxPro 3000 usando el Master mix y las enzimas provistas por Stratagene.

La titulación de los primers se realizó enfrentando concentraciones recíprocas de ambos (Forward y Reverse) desde 100nM a 900nM, eligiendo aquellos que aportan las mayor sensibilidad y el mínimo dímero de primer. Para determinar la temperatura de anillamiento óptima se hizo una RT-PCR de gradiente y se eligió la mejor temperatura para la pareja de primers.

El proceso final se llevo a cabo en un volumen final de 25 microlitros como se describe a continuación: 2 µL de ARN inicial, 12.5 µL de Master Mix SYBR Green (Quantitative RT-PCR Brilliant SYBR Green Master Mix, Stratagene®), 0.0625 µL de StrataScript RT/Rnase Block Enzyme Mixture, (Stratagene®), 0.4mM de cada primer.

El programa del termociclador fue: RT: 30 min. 48°C; PCR: 10 min. 95°C, 40x (45 seg. 95°C y 2 min. 60°C) y al final, 7min. a 72°C. Se realizo al final, una curva de disociación empezando a 70°C e incrementado 1°C cada 30 seg. hasta 95°C.

2.4- Secuenciación de muestras positivas:

Una vez detectadas las muestras positivas se enviaron a secuenciar a SECUGEN S.A.; una vez disponibles las secuencias, se alinearon con la base de datos del GeneBank, procediendo a la posterior identificación de la cepa mediante el empleo del programa BLAST.

RESULTADOS

Tras el análisis de las 20 muestras de suero, se detectaron dos muestras positivas. La interpretación de los resultados se llevó a cabo mediante la curva de amplificación (Imagen 1) y la curva de disociación (Imagen 2).

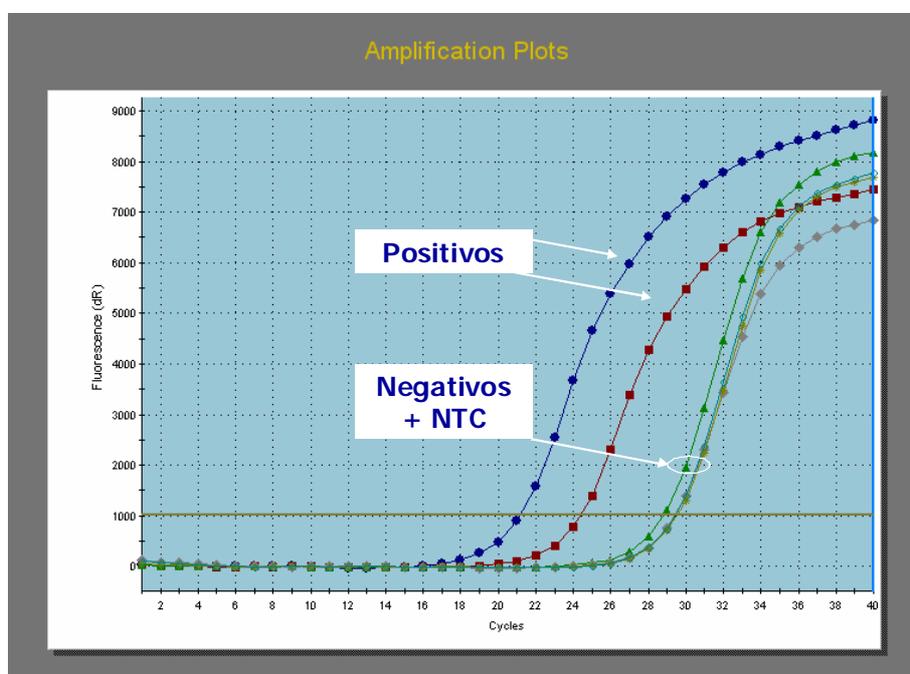


Imagen1. Curva de amplificación. Se distinguen las muestras positivas de las negativas y NTC (blanco)

Con la curva de amplificación se observa la sensibilidad de la técnica, mediante la determinación del ciclo umbral, y con la curva de disociación se evidencia la especificidad de la amplificación.

Esto ofrece la suficiente información para evitar la electroforesis en gel. Las muestras positivas fueron purificadas y secuenciadas. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con la base de datos del GeneBank y analizadas en el BLAST obteniendo una homología del 94% con Pyrsvac-187 (vacuna viva atenuada)

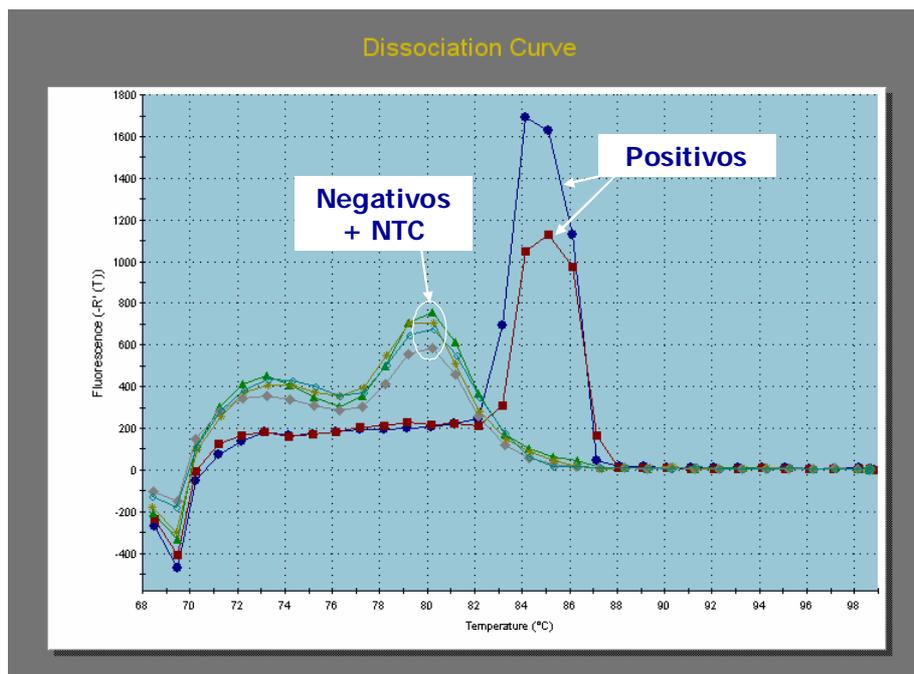


Imagen 2. Curva de disociación. Diferencia entre positivos y negativos (incluyendo dimero de primer)

DISCUSIÓN

En este trabajo ha sido desarrollada una RT-PCR en tiempo real basada en SYBR-GREEN para el diagnóstico de PRRS. La sensibilidad y especificidad, tras analizar los datos, han sido demostradas.

Una vez desarrollada la técnica de qRT-PCR basada en SYBR, hemos podido observar que podría resultar útil en el diagnóstico rutinario de PRRS debido a que presenta una serie de ventajas frente a la convencional. Con un buen diseño de los primers evitamos que se unan los primers entre sí por lo que aumentamos la sensibilidad. Mediante la curva de disociación distinguimos positivos de negativos y de dímero, corrigiendo el error que comete el SYBR al unirse a todo ADN bicatenario.

Desde hace ya unos años se viene constatando las ventajas RT-PCR en tiempo real, y su uso esta siendo cada vez mas extendido (Mackay J, Landt O, 2007; Lutfalla G, Uze G, 2006).

Ha conseguido mayor aceptación que la convencional porque además de ser más rápida y sensible minimiza el riesgo de contaminación cuando se realiza la RT-PCR en un solo paso (Battaglia M *et al*, 1998).

Presenta una mayor sensibilidad, aunque esta se ve ligeramente disminuida debido a la unión de los primer entre ellos. Sin embargo con el trazado de la curva de disociación podemos distinguir la fluorescencia emitida por el dímero de primer de la emitida por el ARN amplificado, además de considerar la posibilidad de ver la amplificación en el punto de mayor eficiencia (Queipo-Ortuno MI *et al*, 2005; Lyon E, 2005).

Por último, se evita electroforesis en gel gracias a la curva de disociación y es posible cuantificar.

La principal aplicación de esta técnica se lleva a cabo mediante el análisis de las secuencias de las muestras positivas ya que permite conocer la cepa con la que las explotaciones estén infectadas y, basándonos en la homología con otras cepas, esto podría resultar muy interesante para elegir cuál sería la vacuna más adecuada para cada explotación, mejorando mucho el manejo de la enfermedad (Meng, X. J. 2000).

BIBLIOGRAFÍA

- Albina, E., (1997). Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview. *Vet. Microbiol.* 55:309–316.
- Allende, R., Lewis, T. L., Lu, Z., Rock, D. L., Kutish, G. F., Ali, A., Doster, A. R., and Osorio, F. A. (1999). North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J. Gen. Virol.* 80:307–315.
- Andreyev, V. G., Wesley, R. D., Mengeling, W. L., Vorwald, A. C., and Lager, K. M. (1997). Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch. Virol.* 142:993–1001.
- Battaglia M, Pedrazzoli P, Palermo B, Lanza A, Bertolini F, Gibelli N, Da Prada GA, Zambelli A, Perotti C, Robustelli della Cuna G. Epithelial tumour cell detection and the unsolved problems of nested RT-PCR: a new sensitive one step method without false positive results. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Oct;22(7):693-8.

- Hall W. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus--a significant disease of pigs. *Aust Vet J.* 2005 May;83(5):260-1
- Lutfalla G, Uze G Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments. *Methods Enzymol.* 2006;410:386-400. Review.
- Lyon E. Discovering rare variants by use of melting temperature shifts seen in melting curve analysis. *Clin Chem.* 2005 Aug;51(8):1331-2
- Mackay J, Landt O. Real-time PCR fluorescent chemistries.. *Methods Mol Biol.* 2007;353:237-61.
- Meng, X. J. (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet. Microbiol.* 74:309–329.
- Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS (1999) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* 73: 270–280
- Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Reguera JM, Garcia-Ordóñez MA, Pachon ME, Gonzalez M, Morata P. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin Microbiol Infect.* 2005 Sep;11(9):713-8.
- Wellenberg GJ. Review: diagnostic methods for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infections] *Tijdschr Diergeneeskd.* 2006 Aug 15;131(16):566-72