



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Estudio comparativo del diagnóstico del virus del PRRS por
RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR en tiempo real.**

**Tesis para obtener el título de
Medica Veterinaria Zootecnista**

Presenta

Zoalli Angélica Uribe Villanueva

Asesores:

Biol. Amanda Gayosso Vázquez

Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales

México, D.F. a 9 de Junio 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A la Máxima Casa de Estudios la **Universidad Nacional Autónoma de México**, y a la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** que me permitieron culminar mis estudios de licenciatura.

A mis padres **Rosa Martha Villanueva Montaña** y **Miguel Uribe Espinosa**, por toda la confianza, el esfuerzo, el apoyo, las enseñanzas y el amor que me brindaron. Sin ustedes esto no sería posible. ¡LOS AMO, MUCHAS GRACIAS!

A mis hermanas, **Xany Uribe Villanueva** y **Yail Teresa Uribe Villanueva**, porque si bien este triunfo es de nuestros padres, también les pertenece a ustedes, son mi ejemplo de fortaleza y perseverancia, cada día agradezco el que estén a mi lado apoyándome incondicionalmente. ¡LAS QUIERO INFINITAMENTE!

A mi sobrina **Julieta Aixa Velázquez Uribe** que me recuerda la inocencia y el por qué de la elección de mi carrera.

A **Jesús Alberto Alvarado Reyes** porque has llegado a la familia para cambiar positivamente nuestras vidas.

A un incomparable compañero, tú **Jorge Alberto Encinas Ocegueda**, por tu cariño e infinito apoyo porque en cada momento que creía desistir encontrabas la forma y las palabras precisas que me motivaban a seguir luchando.

A **Rolando Villanueva Montaña** y **Lourdes Cárdenas Rojo**, por ser como unos segundos padres para mí.

A ti Sebastián Toffito, por esa lealtad y fidelidad que solo un amigo canino puede ofrecer, todos los que me conocen saben lo importante que eres y serás para mí.

A Lorenzo Tughuth, el Embajador de la Paz y las Buenas Costumbres, que me ha robado el corazón.

A Petrolea, porque Julieta y yo siempre te llevaremos en nuestros recuerdos.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Estadística, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM que me abrió las puertas para llevar a cabo de este proyecto.

A mis asesores la Biol. Amanda Gayosso Vázquez y el Dr. Rogelio Alonso Morales quienes con su conocimiento, enseñanza, apoyo, tenacidad y amistad me ayudaron a concluir esta etapa de mi vida.

A mis profesores de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por la formación académica de excelente calidad que me brindaron, así como también a mi honorable jurado, el Biol. Carlos Vázquez, el Dr. Francisco Basurto, el Dr. Humberto Ramírez y el Dr. Iván Sánchez.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Lizeth Toiber, Jorge Vázquez, Rodrigo Téllez, Pablo Pintor, Adriana Martínez, Eduardo Aguilar, Luz González, Jessica Molina, Mario Espinosa, Vianey Ramírez, Benedict López y Alejandro Valdéz, por cada momento que compartimos y los conocimientos que me dejaron cada uno de ellos.

A mis amigos Laura Mille, Mariana Roura, Mónica Candelas, Edith San Germán, Ulises Ramírez, Pablo Escorcía, Marco Ramírez, Mario Palma, Dante Carrillo, Felipe Lugo, Mario Córdoba y muchos más que faltan aunque no por ello menos importantes, gracias por tantas risas, por formar parte de mi vida y brindarme su apoyo en todo momento.

A mi equipo PRRS ¡¡¡gracias totales!!!

Contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino.	4
Diagnóstico.....	6
JUSTIFICACIÓN	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIAL Y MÉTODOS	10
Oligonucleótidos y sondas empleados en la RT-PCR-TR.	10
Diseño de oligonucleótidos para la RT-PCR y PCR anidada.	12
Estandarización de protocolos de RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR.....	13
a) Purificación de ARN viral.....	13
b) Síntesis de ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa (RT). .	14
c) Estandarización de la PCR	14
d) Estandarización de la PCR Anidada.....	15
e) Estandarización de la RT-PCR-Tiempo Real.	15
Obtención del ADN control y estándar de cuantificación para los ensayos de RT-PCR-TR.....	16
a) Amplificación y purificación de la región UTR 3' del virus de PRRS.....	16
b) Clonación de la región UTR 3' del virus de PRRS al plásmido pTZ57R/T..	17
c) Propagación del ADN plasmídico recombinante.....	19
Estandarización de la curva de cuantificación del virus de PRRS con el ADN del plásmido pPZ6.....	19
Cuantificación del ADN del plásmido pPZ6.	19

Sensibilidad y repetibilidad de curva de cuantificación del pPZ6 por PCR-TR	21
Determinación de la sensibilidad y repetibilidad de la RT-PCR-TR.....	22
Determinación de la sensibilidad y repetibilidad de la RT-PCR y PCR anidada	23
Comparativo entre RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR en cuanto a costos y tiempos.....	24
RESULTADOS	25
Clonación y estandarización del control positivo de amplificación pPZ6.	25
a) Amplificación, purificación y clonación del control positivo de cuantificación pPZ6 para los ensayos de RT-PCR-TR.....	25
b) Estandarización de la curva de cuantificación utilizando el control positivo pPZ6	27
c) Sensibilidad y repetibilidad de la curva de cuantificación con ADN de pPZ6 por PCR-TR	29
Determinación de la sensibilidad y repetibilidad de la cuantificación del virus de PRRS por RT-PCR-TR	32
Determinación de la sensibilidad y repetibilidad de la RT-PCR y PCR anidada	35
Análisis comparativo de sensibilidad, costos y tiempos, entre RT-PCR, PCR anidada para ORF5 y ORF7 y RT-PCR-TR de la región UTR 3'	37
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES:	46
Anexo 1. Diluciones decuples seriadas del plásmido pPZ6.	47
Anexo 2. Diluciones decuples seriadas del ARN vacunal de virus de PRRS.	48
Anexo 3. Gráficas de regresión lineal correspondientes a la estandarización de la curva de cuantificación del plásmido pPZ6	49
Anexo 4. Gráficas de regresión lineal correspondientes a las repeticiones de los ensayos de RT-PCR-TR evaluando el ARN vacunal.....	52
Bibliografía	56

Índice de cuadros

Cuadro 1. Secuencia de primers y sonda para la amplificación y detección de la región UTR 3' del virus de PRRS por RT-PCR-TR.	11
Cuadro 2. Iniciadores y sonda del control interno que amplifica un segmento de la proteína M del virus de influenza aviar por RT-PCR-TR.	11
Cuadro 3. Iniciadores para la reacción de PCR externa y anidada del gen ORF5 del virus de PRRS.	12
Cuadro 4. Iniciadores para la reacción de PCR externa y anidada del gen ORF7 del virus de PRRS.	12
Cuadro 5. Cuantificación del ADN del plásmido pPZ6.	28
Cuadro 6. Cuantificación promedio de la concentración del ADN purificado del plásmido recombinante pPZ6.	28
Cuadro 7. Análisis estadístico (promedio, desviación estándar (D.E.), coeficiente de variación (CV%) y número de moléculas calculadas) de 8 ensayos de PCR-TR, para cada uno de los puntos de la curva.	31
Cuadro 8 Análisis estadístico (promedio, desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV%) y número de moléculas calculadas) de 4 ensayos de RT-PCR-TR evaluando la detección del ARN vacunal.	34
Cuadro 9. Límite de sensibilidad de los ensayos de RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR para el virus de PRRS.	38
Cuadro 10. Tiempo requerido para realizar los ensayos de RT-PCR-TR, RT-PCR y PCR anidada.	39
Cuadro 11. Costo por reacción de los consumibles para el ensayo de RT-PCR-TR.	39
Cuadro 12. Costo por reacción de los consumibles para el ensayo de RT-PCR y PCR anidada.	40
Cuadro 13. Costo de los consumibles para la construcción del control positivo pPZ6.	40
Cuadro 14. Costos del diagnóstico de PRRS por RT-PCR-TR cuantitativo y RT-PCR-TR.	41
Cuadro 15. Costos del diagnóstico de PRRS por RT-PCR y PCR anidada. .	41

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del genoma del virus del PRRS.	5
Figura 2. Mapa del vector de clonación pTZ57R/T.....	18
Figura 3. Condiciones óptimas de amplificación para la región UTR 3'	25
Figura 4. Purificación del fragmento UTR 3'	26
Figura 5. Verificación de colonias recombinantes	26
Figura 6. ADN purificado del plásmido pPZ6	27
Figura 7. Gráfica de la repetibilidad de los 8 ensayos de la curva estándar de la cuantificación del plásmido pPZ6.....	30
Figura 8. Promedio de los 8 ensayos de la curva estándar cuantificación pPZ6	31
Figura 9. Gráfica del coeficiente de variación de las diluciones del plásmido pPZ6	31
Figura 10. Gráfica de la repetibilidad de los 4 ensayos de la cuantificación del ARN vacunal	33
Figura 11. Gráfica del promedio de los 4 ensayos de la cuantificación del ARN viral y de la curva del ADN pPZ6.....	34
Figura 12. Gráfica del coeficiente de variación de las diluciones del plásmido pPZ6	35
Figura 13. Sensibilidad del gen ORF5 por RT-PCR y PCR anidada	36
Figura 14. Sensibilidad del fragmento del ORF7 por RT-PCR y PCR anidada	37

Abreviaturas

PRRS. Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino.

E.U. Estados Unidos.

ARN. Ácido ribonucleico.

ORF. Open reading frame (marco abierto de lectura).

UTR 3´. Región no traducida 3´.

AV. Aislamiento viral.

IFD. Inmunofluorescencia directa.

SVN. Virus seroneutralización.

IPMA. Inmunoperoxidasa en monocapa.

ELISA. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

IH. Inmunohistoquímica.

IFI. Inmunofluorescencia indirecta.

RFLP. Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

RT. Transcripción inversa.

Ct. Ciclo umbral.

NCBI. National Center for Biotechnology Information.

PCR-TR. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

RT-PCR-TR. Transcripción reversa reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

DEPC. Dietilpirocarbonatada.

ADNc. Acido desoxirribonucleico complementario.

CMS. Sitio múltiple de clonación.

MP. Marcador de peso.

Pb. Pares de bases

DE. Desviación estándar.

CV. Coeficiente de variación.

R². Coeficiente de correlación.

RESUMEN

URIBE VILLANUEVA ZOALLI ANGÉLICA. Estudio comparativo del diagnóstico del virus del PRRS por RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR en tiempo real (bajo la dirección de: Biol. Amanda Gayosso Vázquez y Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales

El virus del Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (PRRSV), es causante de pérdidas económicas considerables, por lo que para su control es necesario un diagnóstico rápido y eficiente. Las técnicas de biología molecular, como la Transcripción Reversa (RT) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), así como la PCR anidada y la PCR en tiempo real (PCR-TR), son empleadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. En este trabajo se estandarizaron y compararon los niveles de sensibilidad de la RT-PCR-TR, RT-PCR y PCR anidada para el diagnóstico del virus de PRRS, estimando costos y tiempos requeridos. Se definieron los iniciadores para amplificar segmentos diagnósticos del virus del PRRS para las diferentes técnicas. Para la RT-PCR y PCR anidada se evaluaron fragmentos del gen ORF5 y ORF7. Para la RT-PCR-TR se seleccionó un segmento de la región UTR 3', el cual fue clonado y utilizado como estándar de cuantificación. El límite de sensibilidad alcanzado por la RT-PCR-TR fue de 4×10^3 moléculas, empleando el plásmido estándar de cuantificación; en cambio usando el ARN viral obtenido de la vacuna Igelvac® PRRS se detectaron hasta 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; empleando el ORF7 fue de 5×10^2 unidades virales y 0.5 unidades virales. En conclusión se observó que la PCR anidada es más sensible, aunque es más costosa y tardada, pero permite recuperar el amplicón para clonarlo o secuenciarlo y determinar la variabilidad génica viral. En tanto que la RT-PCR-TR es la más económica y rápida, siendo muy conveniente en estudios epidemiológicos, en el monitoreo de bioseguridad en granjas así como en la titulación viral.

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

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (PRRS), provoca un alto impacto económico en la porcicultura, con pérdidas de hasta \$664 millones de dólares anuales en Estados Unidos (E.U.)¹ y en México hasta \$400 millones de pesos.² Se reconoció clínicamente en 1987 en Carolina del Norte, E.U. y posteriormente en Europa a finales de 1990. Se han identificado dos grupos de cepas: la cepa europea (Lelystad) o tipo I y la cepa Americana (VR-2332) o tipo II.^{3,4} Desde su aparición, la cepa americana se ha extendido prácticamente a nivel mundial, existiendo algunas regiones libres como Australia y los países escandinavos.⁵

En 1992 se dieron los primeros informes del virus de PRRS en México, diseminándose en todas las regiones de producción porcina del país. Dentro de los estados con mayor producción porcina, a la fecha se estima que la prevalencia de PRRS es del 95% en Sonora⁶, del 90.1% en Jalisco⁷ y en Yucatán del 39.4%⁸. Se prevé que casi el 100% de las granjas comerciales son positivas al virus.⁹

El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino.

El PRRS es una enfermedad infecciosa causada por un virus de la familia Arteriviridae del género Arterivirus; su genoma es una molécula de ARN lineal de cadena sencilla, de polaridad positiva, y de aproximadamente 15kb (figura

1) C

O F

en inglés Open Reading Frame). Los ORF1a y ORF1b codifican para la replicación del ARN y su transcripción, del ORF2 al ORF6 codifican para una serie de polipéptidos con características de proteínas de membrana como: GP2, GP3, GP4 y GP5 o glicoproteína de envoltura, la proteína M (de membrana) es codificada por el ORF6. El ORF7 codifica para la proteína N de la nucleocápside, es altamente antigénica y con una región conservada tanto en cepas europeas como americanas.^{10,11} Es por ello que el ORF7 es uno de los genes más estudiado y se emplea como blanco en las pruebas diagnósticas serológicas. Otro gen muy utilizado es el ORF 5 que pertenece a la glicoproteína de envoltura, esta proteína activa al sistema inmune y por lo tanto se usa para determinar la variabilidad genética de las poblaciones virales y el establecimiento de las relaciones filogenéticas

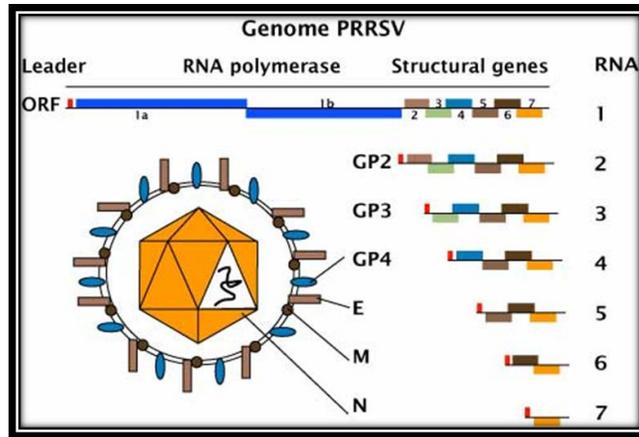


Figura 1. Esquema del genoma del virus del PRRS¹².

El virus del PRRS se difunde rápidamente en la granja, las vías directas de transmisión son por contacto directo con animales infectados o por secreciones como sangre, semen, saliva, heces, aerosoles, leche y calostro. La vía indirecta se genera por fómites o movilización de animales entre las granjas.

El virus es capaz de producir grandes trastornos en granja, ya que afecta tanto a reproductores, lechones, así como a los animales de engorda. Es decir, afecta a todo el ciclo productivo provocando daños reproductivos y síntomas respiratorios, la gravedad de la enfermedad depende de la virulencia de la cepa, la inmunidad previa obtenida por cepas vacunales o de campo y la presencia de otras infecciones endémicas.⁵

El cuadro reproductivo se caracteriza por: agalactia, abortos en el último tercio de gestación, lechones nacidos débiles o momificados y retornos irregulares al celo en hembras reproductoras, en machos observamos disminución de la libido y por lo tanto también en la calidad del eyaculado.^{5,13}

Los signos respiratorios consisten en: tos, estornudos, disnea, taquipnea, descargas muconasales, fiebre, letargia, neumonía, etc. También se presenta cianosis en orejas, vulva y cola, edema subcutáneo y en lechones es notable una disminución en la tasa de crecimiento, debilidad, hemorragias, falta de coordinación y temblores musculares. Otra de las características de este agente es su capacidad de inmunosupresión en el hospedador, por lo que aparecen infecciones secundarias.^{5,13}

Diagnóstico

El diagnóstico de esta enfermedad infecciosa, se puede realizar mediante técnicas convencionales que detectan el virus, como es el caso del aislamiento viral (AV) y la inmunofluorescencia directa (IFD) y por la determinación de anticuerpos específicos contra PRRSV, como los ensayos de virus seroneutralización (SVN), inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA), ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), la inmunohistoquímica (IH) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI).¹⁴ En la actualidad, los métodos tradicionales están siendo desplazados por los métodos moleculares que detectan las partículas víricas y/o sus componentes, como los ácidos nucleicos, proteínas estructurales y no estructurales, enzimas, etc. En general el uso de estos sistemas para el diagnóstico requiere de personal capacitado, equipo especializado y en el caso de algunas pruebas convencionales el tiempo de entrega de los resultados son tardíos.^{15,16}

En los últimos años las técnicas moleculares se han utilizado con gran eficacia para acelerar el diagnóstico a través de la detección de material genético de los patógenos. Las primeras técnicas utilizadas en los años 70 se basaban en hibridación de sondas específicas, confiriendo una mayor sensibilidad. En la década de los 80, el uso de la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando enzimas termoestables (polimerasas), mejoró notablemente la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico y el empleo de endonucleasas de restricción permitió la detección de variantes genéticas (Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción o RFLP). Recientemente con la PCR en tiempo real, se optimiza la sensibilidad y la posibilidad de cuantificar la carga viral presente.^{17,18}

En comparación con los métodos convencionales de diagnóstico viral, las técnicas moleculares tienen como ventaja, una alta sensibilidad porque detecta pequeñas cantidades del patógeno, la utilización de iniciadores que reconocen la secuencia de ADN elegida le confiere gran especificidad, proporcionan rapidez en obtener resultados en comparación con otras técnicas tradicionales y el riesgo por contaminación se disminuye. Las técnicas moleculares evalúan los ácidos nucleicos en lugar de la viabilidad de microorganismos, dentro de los ensayos más utilizados en diagnóstico molecular en el virus de PRRS se encuentra la transcripción inversa (RT), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la PCR anidada. Esta última se fundamenta en emplear una reamplificación utilizando iniciadores anidados. Esta estrategia mejora los niveles de especificidad así como de sensibilidad y

se puede realizar a partir de muestras con poca cantidad de virus. Otro método es la PCR en tiempo real o cuantitativa (PCR-TR) que puede emplear sondas específicas de degradación que tienen unido un fluorocromo el cual hibrida en el producto de amplificación entre los iniciadores que amplifican la región de interés. Esta reacción requiere un termociclador con capacidad para detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo.^{14,15,16}

La principal ventaja que presenta la tecnología de la PCR en tiempo real es la cuantificación de las moléculas que son amplificadas pudiendo ser absoluta y relativa. En el caso de la primera se requiere elaborar una curva que sirva como referencia de cuantificación, que se establece amplificando diferentes cantidades conocidas de un ADN de referencia. De esta manera se relaciona la cantidad inicial del ADN de la muestra y el número del ciclo de amplificación o ciclo umbral (Ct) en el cual el producto de amplificación se vuelve logarítmico y por lo tanto detectable debido a la acumulación de fluorescencia; pudiendo calcular la cantidad inicial de ADN mediante una regresión lineal.¹⁹

JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta prevalencia, propagación y pérdidas económicas que genera el virus de PRRS en la porcicultura nacional, es necesario disponer de un diagnóstico temprano, preciso y oportuno que detecte a los animales activamente infectados, así como aquellos que están excretando el virus e identificar las variantes virales que están circulando en las granjas porcinas.

Los métodos moleculares como la RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR poseen gran especificidad, sensibilidad y rapidez; tienen diversas aplicaciones, aunque requieren de infraestructura para trabajar y personal capacitado. En el país existen kits comerciales basados en RT-PCR-TR para el diagnóstico del PRRS, sin embargo resultan ser costosos con tiempo de entrega prolongado.

Por lo que es importante contar con un método de RT-PCR-TR más económico y accesible para el diagnóstico de esta enfermedad.

HIPÓTESIS

En el diagnóstico molecular del virus del PRRS se conoce que la RT-PCR-TR así como la PCR anidada poseen una mayor sensibilidad frente a la RT-PCR punto final, teniendo cada una diferentes ventajas, limitaciones y alcances, en cuanto a tiempo de ejecución, costos y aplicaciones.

OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio comparativo de la especificidad, sensibilidad, tiempo de desarrollo de las pruebas, costos y aplicaciones, evaluando las técnicas de RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR para el diagnóstico molecular del virus de PRRS.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarización de RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR para la amplificación de fragmentos de interés.
2. Desarrollo y evaluación de un control positivo y estándar de cuantificación para el diagnóstico de PRRS por RT-PCR-TR.
3. Determinación de la sensibilidad y especificidad de las técnicas de RT-PCR, PCR anidado y RT-PCR-TR para el virus del PRRS.
4. Análisis y determinación de la repetibilidad alcanzado por las técnicas de RT-PCR, PCR anidado y RT-PCR-TR.
5. Estudio comparativo en cuanto a aplicaciones, costos y tiempos de los ensayos de RT-PCR, PCR anidado y RT-PCR-TR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Oligonucleótidos y sondas empleados en la RT-PCR-TR.

La selección de los oligonucleótidos y sondas utilizados en el ensayo de RT-PCR-TR se basó en el análisis de varios artículos científicos donde se la detección del virus de PRRS se realiza empleando sondas Taqman. Las secuencias de los iniciadores y las sondas se emplearon en consultas con la herramienta BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para efectuar el análisis de identidad contra secuencias de PRRSV depositadas en GenBank® para verificar que estos no estuvieran en regiones polimórficas. Se encontró que la región no traducida 3' (por sus siglas en

inglés UTR 3') es la menos variable y adecuada²⁰. Los primers y sonda seleccionados para la técnica de RT-PCR-TR se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Secuencia de primers y sonda para la amplificación y detección de la región UTR 3' del virus de PRRS por RT-PCR-TR.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición	Tamaño
PRRS-US-Fw	ATRATGRGCTGGCATTCC	15,257-15,274	
PRRS-US-Rv	ACACGGTCGCCCTAATTG	15,353-15,370	114pb
PRRS- US-Probe	HEX-TRTGGTGAATG GCACTGATTGAYA-Hex	15,307-15,330	

La mezcla de reacción de la RT-PCR-TR incorpora un control interno el cual siempre amplifica y es detectado, se encarga de validar la reacción de PCR en tiempo real y permite identificar resultados falsos negativos, que podrían darse por inhibición de la reacción de PCR, bien sea por algún contaminante en la muestra o alguna falla de los ingredientes (cuadro 2). Este control interno se incluye en la mezcla de reacción, es ADN de un plásmido recombinante que contiene la región de la proteína M del virus de influenza aviar, así como los iniciadores y sonda específica.²¹

Cuadro 2. Iniciadores y sonda del control interno que amplifica un segmento de la proteína M del virus de influenza aviar por RT-PCR-TR.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición	Tamaño
IA-Fw	AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG	24-54	
IA-Rv	TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG	101-131	101pb
IA-Probe	FAM-TCAGGCCCCC TCAAAGCCGA-TAMRA	74-99	

Diseño de oligonucleótidos para la RT-PCR y PCR anidada.

Se diseñaron y sintetizaron iniciadores para la técnica de RT-PCR y PCR anidada que amplifican un segmento de 793pb y 740pb respectivamente que incluye en el segmento amplificado el gen completo ORF 5 (cuadro 3).

Cuadro 3. Iniciadores para la reacción de PCR externa y anidada del gen ORF5 del virus de PRRS.

Nombre	Secuencia	Posición	Tamaño
ORF5 F1a	TTGCTSCATTTCHTGACACC	13,672-13,691	793pb
ORF5 R1a	CCGCGACTCACCTTTAGGGC	14,468-14,487	
ORF5 F2a	ATRATGRGCTGGCATTCC	13,699-13,718	740pb
ORF5 R2a	ATGAGGTGGGCAACTGTTTTAGC	14,445-14,468	

De igual forma se diseñaron y sintetizaron iniciadores para la técnica de RT-PCR y PCR anidada que amplifican un segmento de 557pb y 370pb respectivamente que contiene el gen completo del ORF 7 (cuadro 4).

Cuadro 4 Iniciadores para la reacción de PCR externa y anidada del gen ORF7 del virus de PRRS.

Nombre	Secuencia	Posición	Tamaño
ORF7 EF	TACGGTCAACGGCACATTGG	14,773-14,792	557pb
ORF7 ER	GGTGACTTAGAGGCACAATG	15,305-15,325	
ORF7 FBam	ATGCCAAATAACAACGGCAAG	14,876-14,907	370pb
ORF7 RBam	TCATGCTGAGGGTGATGCTGCTGTG	15,233-15,257	

Estandarización de protocolos de RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR.

a) Purificación de ARN viral

A partir de una muestra de vacuna comercial Ingelvac® PRRS MLV, se obtuvo ARN del virus de PRRS siguiendo el protocolo:

Por cada 500 µl de muestra se adicionó 1 ml de RNAGt (Biotecmol®) en un microtubo de 2 ml, se mezcló por 15 segundos en un vortex, posteriormente se adicionó 200 µl de cloroformo y se homogenizó por 15 segundos en un vortex. Posteriormente se centrifugó a 15,000 G/10min a 4°C; se recuperó la fase acuosa en un microtubo de fondo cónico de 1.5 ml, se adicionaron 10 µg de glicógeno, se mezcló por inversión; se agregó un volumen de isopropanol absoluto frío y se homogenizó por inversión. Se centrifugó a 15,000 G/10min a 4°C se decantó y adicionó a la pastilla 500 µl de etanol al 75% preparado con agua dietilpirocarbonatada (DEPC) y se mezcló por inversión; en seguida se centrifugó a 12,700 G/7min 4°C. Se decantó y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Finalmente la pastilla de ARN se rehidrató en 20 µl de agua DEPC y se almacenó a -70°C hasta su uso.

b) Síntesis de ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa (RT).

A partir del ARN viral purificado se obtuvo el ADNc de los genes ORF5, ORF7 y UTR 3', en un volumen final de 20 μ l bajo el siguiente protocolo:

Se colocaron en un tubo de PCR 9 μ l del ARN, 100 pmoles del iniciador reverso, amortiguador de reacción 1X (proporcionado por

N P 1 mM c/u, 40 U de inhibidor de RNasas (Fermentas® catálogo EO0381), 200 U de transcriptasa reversa (Fermentas®, catálogo EP0451), agua DEPC cbp 20 μ l y se incubó por una hora a 42°C.

c) Estandarización de la PCR

Para la estandarización de las condiciones de amplificación de los diferentes oligonucleótidos a utilizarse, se realizaron ensayos de PCR a partir del ADNc previamente sintetizado de las regiones de los genes ORF5 y ORF7. Se evaluaron diferentes temperaturas de alineamiento en los ciclos de la PCR en un volumen final de 20 μ

protocolo: se tomaron 4 μ l ADNc, 0.5 μ M z

externos (ORF5 R1a, ORF 5 F1a y ORF7 EF, ORF7 ER), 0.4 M

N P (Fermentas® RO192), 1 U de Amplificasa (Biotecmol®), amortiguador de reacción 1X (proporcionado por proveedor), 1.5 mM $MgCl_2$ (proporcionado por proveedor) y agua cpb 20 μ l

finales de amplificación fueron: 1 ciclo a 94°C/5min; 30 ciclos a 94°C/30seg, 58°C/30seg, 72°C/30seg; 1 ciclo a 72°C/15min.

d) Estandarización de la PCR Anidada.

A partir de la PCR externa se realizaron ensayos de PCR anidada de los segmentos previamente amplificados del gen ORF5 y ORF7, con diferentes temperaturas de disociación en un volumen final de 20 μ bajo el siguiente protocolo: se tomaron 2 μ e reacción de PCR externa, 0.4 μ M z ORF5 R2a, ORF5 F2a y ORF7 RBam, ORF7RBAm), 0.2 M N P (Fermentas® RO192), 1U de Polimerasa (Biotecmol®), amortiguador de reacción 1X (proporcionado por proveedor), 1.5 mM MgCl₂ (proporcionado por proveedor) y agua cpb 20 μ L f f ó fueron: 1 ciclo a 94°C/5min; 30 ciclos a 94°C/30seg, 58°C/30seg, 72°C/30seg; 1 ciclo a 72°C/15min.

e) Estandarización de la RT-PCR-Tiempo Real.

A partir de ARN viral purificado se estandarizó la RT-PCR-Tiempo Real en un solo paso amplificando la región UTR3' en un volumen final de 20 μ l, bajo el siguiente protocolo: Se mezclaron 10 μ A N 10 μ z ó q : 100 pg de ADN recombinante de IA, 0.5 μ M z iniciadores del control interno de IA (IA Fw e IA Rv), 0.1 μ M IA IA-Probe), 0.5 μ M iniciadores (PRRS-US-Fw y PRRS-US-Rv-), 0.1 μ M PRRS (PRRS-US-Probe), , 40 U de RT (Fermentas®, catálogo EP0442), 4 U

inhibidor de RNasas (Fermentas®, catálogo EO0381), 0.2 mM de dNTPs (Fermentas® RO192), 1 U de Polimerasa (Biotecmol®), amortiguador de reacción 1X (proporcionado por proveedor), 1.5 mM de MgCl₂ (proporcionado por proveedor) y agua cbp 10 μ L condiciones finales de amplificación fueron: 1 ciclo a 42°C/30min, 95°C/10min, 40 ciclos a 95°C/15seg y 60°C/45seg.

Obtención del ADN control y estándar de cuantificación para los ensayos de RT-PCR-TR.

El control positivo y estándar de cuantificación para el virus de PRRS consiste en un plásmido el cual tiene clonado el blanco de amplificación del ensayo de RT-PCR-TR. Este fragmento consiste en el extremo 3' del UTR viral.

a) Amplificación y purificación de la región UTR 3' del virus de PRRS.

La construcción del control para la PCR-TR se llevó a cabo a partir de una reacción de RT-PCR, que amplificó el segmento correspondiente a 114 pb de la región UTR 3' del virus de PRRS. El producto amplificado fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 3% y purificado por el método de perlas de sílica²². Para esto el fragmento purificado del gel se pesó y se adicionaron 3 volúmenes de NaI 6 M, incubándose 10 minutos a 55°C. Una vez

disuelta la agarosa, se adicionaron 20 μ l de H_2O y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, se incubó 30 minutos a 4°C; y se centrifugó a 15,300 G por 4 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó en dos ocasiones con 500 μ l de N C 50 mM , Tris HCl pH7.5 10 mM, EDTA 2.5 mM, etanol 50% v/v). La pastilla se secó y se agregó 20 μ l H_2O , se incubó 10 minutos a 55°C, se centrifugó a temperatura ambiente bajo las mismas condiciones y el ADN soluble en el sobrenadante fue recuperado. La integridad del fragmento purificado fue evaluado por electroforesis en agarosa al 3% y cuantificado por espectrofotometría.

b) Clonación de la región UTR 3' del virus de PRRS al plásmido pTZ57R/T.

La clonación del fragmento UTR 3', previamente amplificado y purificado, fue ligado al el vector comercial plasmídico pTZ57R/T (Life TechnologiesTM PC C K marca Fermentas® catálogo K1214) siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 2).

Brevemente, la ligación se realizó en un volumen final de 20 μl , conteniendo 110 ng de vector, 5 U de T4 DNA ligasa (Fermentas® catálogo EL0014), 2 μl de buffer de ligación 10X y 20 ng del amplicón purificado de la región UTR 3', incubando la reacción por 16 hrs a 16°C.

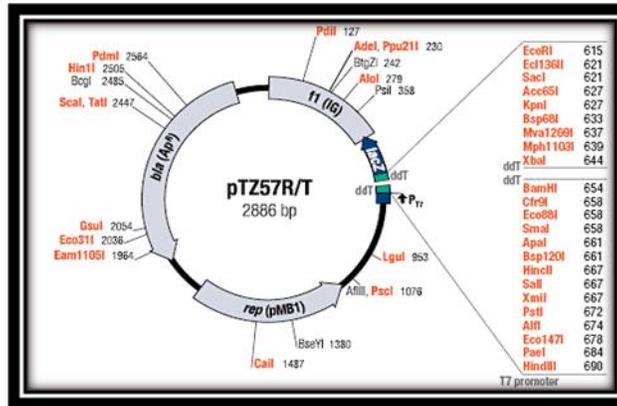


Figura 2. Mapa del vector de clonación pTZ57R/T. Contiene los primers universales M13/pUC flanqueando el sitio múltiple de clonación (CMS), un gen de resistencia a ampicilina y un gen lacZ para la selección por color de recombinantes.

Ocho microlitros (44 ng) de la reacción de ligación fueron empleados en transformar 100 µl de células E DH5α, incubándose 30 minutos en hielo, 1 minuto a 42°C, 2 minutos en hielo, adicionando 900 µl LB incubando 1 hora a 37°C con agitación constante. Quinientos microlitros de esta mezcla fueron espatulados en una placa de medio sólido LB suplementado con 100 µg / 0 µg / X y 266 µg / IP G. Las placas se incubaron a 37°C de 12 a 24 horas.

Para la selección de plásmidos recombinantes, se evaluaron quince colonias blancas. Para esto cada colonia fue lisada en 60 µl de agua destilada a 94°C por 10 min, a partir de las cuales se realizó una PCR para verificar la presencia del segmento de interés (UTR 3' PRRS) bajo las siguientes condiciones: a 5 µl del lisado bacteriano se le agrega una mezcla que contiene iniciadores universales Forward y Reverse del M13 a 0.2 µM, dNTP's 0.2 mM, Amplificasa

(Biotecmol®) 1 U/μl, amortiguador de reacción 1X (proporcionado por proveedor), y MgCl₂ 1.5 mM (proporcionado por el proveedor), en un volumen final de 20 μl; 94°C/5min (1 ciclo), 94°C/30seg, 56°C/30seg, 72°C/30seg (30 ciclos) y una extensión final de 72°C/15min. Los productos de amplificación fueron evaluados por electroforesis en agarosa al 3%, esperando un amplicón de 268 pb. Una clona positiva (llamada pPZ6) se seleccionó para propagarla y obtener el ADN del plásmido recombinante.

c) Propagación del ADN plasmídico recombinante.

Se expandió la clona recombinante pPZ6 en 250 ml de medio líquido LB suplementado con ampicilina 100 μg/ml incubando durante 24 horas en agitación constante. La pastilla bacteriana fue recuperada por centrifugación a 3000 G por 10min y el ADN plasmídico recombinante fue obtenido mediante el kit Zippy™ Plasmid Maxiprep (Zymo Research® catálogo D4028) de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Estandarización de la curva de cuantificación del virus de PRRS con el DNA del plásmido pPZ6

Cuantificación del ADN del plásmido pPZ6.

Una vez que se obtuvo el ADN plasmídico pPZ6 se cuantificó por fluorometría en un termociclador Rotor-Gene 6000 mediante el ensayo de PicoGreen®.²³

Para la cuantificación viral por RT-PCR-TR se establece una curva estándar en donde se amplifican cantidades conocidas del ADN (de 1 a 1×10^{-4} nanogramos) del plásmido pPZ6. La cuantificación se expresa en número de moléculas o número de copias y no en nanogramos de ADN. Por esto es necesario conocer el No de moléculas que tiene un nanogramo del ADN del plásmido pPZ6.

El cálculo del número de moléculas que tiene un ng del pPZ6 se efectuó con la siguiente fórmula.²⁴

Peso en Daltons (g/mol) = (tamaño en pares de bases del plásmido + tamaño en pares de bases del inserto) (330 Da X 2 nucleótidos/pb), posteriormente (Número de Avogadro)/ (ng/mol) = (ng/molécula) = Número de moléculas/ng

$$\frac{(X \text{ ng})(6.022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol})}{(N)(660 \text{ g/mol})(1 \times 10^{-9} \text{ ng/g})} = X \text{ moléculas/ng}$$

Donde:

X= cantidad en ng del plásmido

N= tamaño en pares de bases del plásmido recombinante

660 g/mol= peso molecular promedio de un par de base

Sensibilidad y repetibilidad de la curva de cuantificación del pPZ6 por PCR-TR.

Para conocer la mínima cantidad de moléculas que pueden ser detectadas y amplificadas, se realizaron diluciones decuples seriadas de 1 a 1×10^{-8} ng del ADN del plásmido control positivo pPZ6 (Anexo 1) que fueron evaluados por triplicado mediante PCR-TR bajo el siguiente protocolo: 10 μ l de cada dilución de DNA pPZ6 en 10 μ l de reacción que contiene 0.5 μ M de PRRS-US-Fw y PRRS-US-Rv-), 0.1 μ M de PRRS-US-Probe), 0.5 μ M de IA Fw y IA Rv-), 0.1 μ M de IA-IA-Probe), 100 pg de ADN recombinante de IA como control interno, 0.2 mM de dNTPs (Fermentas® RO192), 1 U de Amplificasa (Biotecmol®), 1X de amortiguador de reacción (proporcionado por proveedor), 1.5 mM de MgCl₂ (proporcionado por proveedor) y agua cbp 10 μ l. Condiciones de amplificación: 95°C/10min, 40 ciclos a 95°C/15seg y 60°C/45seg. Este ensayo se realizó en cuatro ocasiones.

Con base a los resultados, se determinó el rango óptimo de la curva de cuantificación a utilizar, para los ensayos posteriores de sensibilidad por la técnica de RT-PCR-TR.

Determinación de la sensibilidad y repetibilidad de la RT-PCR-TR.

En los ensayos de RT-PCR-TR, se trabajó con la vacuna Ingelvac® PRRS MLV con un título de $5 \times 10^{4.9}$ virus en 20ml. Se realizó la extracción de ARN a partir de 500µl de vacuna (100,000 unidades virales) por el método de fenol ácido previamente descrito, rehidratando el ARN viral en un volumen final de 20 µl con agua DEPC, considerando que hay 5,000 cadenas del genoma viral por microlitro.

Para el ensayo de sensibilidad de RT-PCR-TR se realizaron 6 diluciones decuples seriadas a partir del ARN obtenido, partiendo de 1:10, estimando el número de cadenas virales presentes en cada dilución (Anexo 2). Las determinaciones se realizaron por triplicado y en cuatro experimentos independientes.

Diez microlitros de cada dilución del ARN viral, así como 10 µl de las diluciones del ADN del pPZ6, se agregaron a 10µ una mezcla de reacción conteniendo: 100 pg de plásmido IA 0.5 µM c/u, iniciadores del control interno de IA (IA Fw e IA 0.1 µM IA (IA-P 0.5 µM c/u de iniciadores (PRRS-US-Fw y PRRS-US-Rv-), 0.1 µM P S P S-US-Probe), 40U RT (Fermentas®, catálogo EP0442), 4 U inhibidor de RNasas (Fermentas®, catálogo EO0381), 0.2 mM c/u de dNTPs (Fermentas® RO192), 1 U de Amplificasa (Biotecmol®), amortiguador de reacción 1X (proporcionado por proveedor), 1.5 mM de MgCl₂ (proporcionado por proveedor) y

10 µ L

f ó f : 1

42°C/30min, 95°C/10min, 40 ciclos a 95°C/15seg y 60°C/45seg.

Determinación de la sensibilidad y repetibilidad de la RT-PCR y PCR anidada.

Los ensayos de sensibilidad por RT-PCR y PCR anidada se realizaron para la amplificación de los genes ORF5 y ORF7. Se empleó como fuente de material viral la vacuna Ingelvac® PRRS MLV, purificando el ARN viral a partir de 1 ml de vacuna y se rehidrató en 20 µl.

Se sintetizó el ADNc de los ORF 5 y 7 agregando 9 µl de ARN viral a una solución conteniendo 100 pmol del iniciador reverso respectivo (ORF5 R1a y ORF7 ER), dNTP s 1 mM (Fermentas® RO192), 40 U de inhibidor de RNasas (Fermentas®, catálogo EO0381), 200 U de transcriptasa reversa (Fermentas®, catálogo EP0442) amortiguador de reacción 1X (proporcionado por proveedor) y agua DEPC cbp 20 µl, incubándose por una hora a 42°C.

Se realizó una PCR con los primers externos mostrados en el cuadro 3 y 4 que corresponden a la región del gen ORF5 y ORF7, a cada una de 8 diluciones decuples seriadas (10^{-1} - 10^{-8}) a partir del ADNc, tomando 10 µl de cada dilución con 10 µl de reacción, la cual contiene: 1 µM x (ORF5 R2a, ORF5 F2a y ORF7 RBam, ORF7RBam), 0.8 M N P (Fermentas® RO192), 2 U de Amplificasa (Biotecmol®), amortiguador de reacción 1X

(proporcionados por el proveedor), 3 mM MgCl₂ (proporcionados por proveedor) y 20 μ L de dNTPs (1:1) : 1 ciclo a 94°C/5min; 30 ciclos a 94°C/30seg, 58°C/30seg, 72°C/30seg; 1 ciclo a 72°C/15min.

Para realizar la PCR anidada se tomaron 2 μl de la reacción de PCR anterior agregándola a una mezcla conteniendo 0.4 μM c/u iniciadores internos (ORF5R2a, ORF5F2a y ORF7FBam, ORF7RBam 0.2 M NTP (Fermentas® RO192), 1U de Amplificasa (Biotecmol®), amortiguador de reacción 1X (proporcionados por el proveedor), 1.5mM MgCl₂ (proporcionados por el proveedor) y 20 μ L de dNTPs (1:1) condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 94°C/5min; 30 ciclos a 94°C/30seg, 58°C/30seg, 72°C/30seg; 1 ciclo a 72°C/15min. Los productos generados se evaluaron por electroforesis en agarosa al 3%. Para determinar la sensibilidad alcanzada por este método se estimó el número de copias virales presentes en cada dilución considerando el título de la vacuna (Anexo 2). Los ensayos se realizaron en 4 ocasiones con la finalidad de observar la repetibilidad.

Comparativo entre RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR en cuanto a costos y tiempos.

Se realizó un estudio de costos basado en los consumibles y reactivos necesarios para cada prueba molecular de RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR.

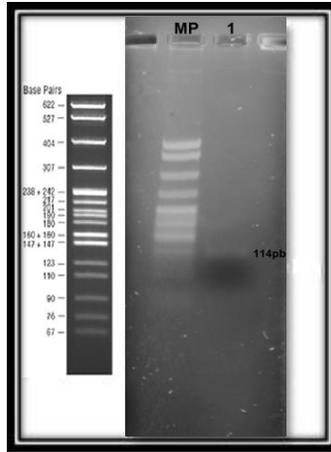


Figura 4 Purificación del fragmento UTR3´. Electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Marcador de peso molecular (MP) pBR 322/Mspl (150 ng), carril 1 UTR3´.

En la figura 5 se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 3% de la amplificación por PCR (268 pb) con los primers universales de M13 de 15 colonias para corroborar la clonación de la región UTR3´ en el vector pTZ57R/T (figura 5).

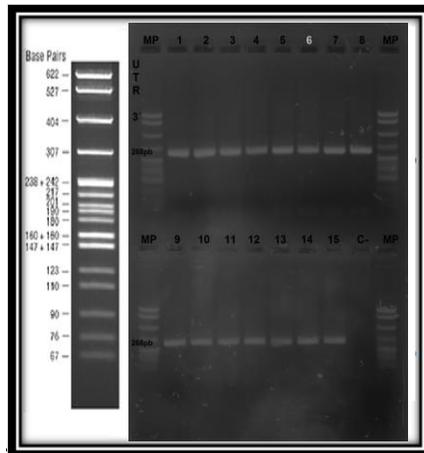


Figura 5 Verificación de colonias recombinantes. Electroforesis en gel de agarosa al 3%, marcador de peso molecular pBR 322/Mspl, en los pozos del 1 al 15 se ven los productos de amplificación de 268pb de las colonias recombinantes seleccionadas.

Una de la colonias recombinantes (pPZ6), con el fin de obtener cantidades suficientes de ADN del plásmido, se expandió y el ADN se purificó bajo el protocolo del kit Plasmid Purification del laboratorio Qiagen® (catálogo 12263). Para verificar la calidad e integridad del ADN plasmídico obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% observando el ADN plasmídico en sus diferentes conformaciones (figura 6).

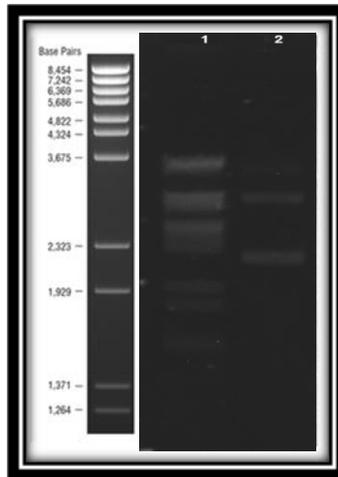


Figura 6 ADN purificado del plásmido pPZ6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. En el carril 1 se encuentra el marcador de λ /B II 2 ADN f á PZ6

b) Estandarización de la curva de cuantificación utilizando el control positivo pPZ6.

En el cuadro 5 se muestra la cuantificación de las diferentes diluciones del ADN plasmídico recombinante pPZ6 purificado, como ADN estándar de cuantificación se empleó ADN del bacteriófago lambda.

En el cuadro 6 se muestra el valor promedio de la estimación de la concentración del ADN del plásmido pPZ6 purificado.

Cuadro 5. Cuantificación del ADN del plásmido pPZ6. Se muestra la concentración obtenida de la curva estándar de lambda (filas 1-6) y de las diluciones del plásmido pPZ6 (filas 7-10).

	Muestra		Concentración requerida (ng/rx)	Concentración calculada (ng/100µl de reacción)
1	DNA	λ	100	100
2	DNA	λ	50	49
3	DNA	λ	25	25
4	DNA	λ	10	10
5	DNA	λ	5	5
6	DNA	λ	1	1
7	pPZ6 1/200			53
8	pPZ6 1/200			53
9	pPZ6 1/400			28
10	pPZ6 1/400			26

$$\frac{(\text{concentración calculada})(\text{factor de dilución})}{100} = \text{ng}/\mu\text{l}$$

Cuadro 6. Cuantificación promedio de la concentración del ADN purificado del plásmido recombinante pPZ6.

	Concentración	Promedio
(53ng)(200)/100	106 ng/µl	107 ng/µl
(27ng)(400)/100	108 ng/µl	

El rendimiento de la purificación del ADN del plásmido pPZ6 obtenido a partir de 250ml de cultivo fue de 214 µg.

El número de moléculas por ng de ADN del plásmido pPZ6 fue el siguiente:

$$\frac{(1\text{ng}) (6.022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol})}{(3000 \times 660\text{g/mol}) (1 \times 10^9)} = 3.04 \times 10^8 \text{ moléculas/ng}$$

c) Sensibilidad y repetibilidad de la curva de cuantificación con ADN de pPZ6 por PCR-TR.

En las figuras 15 a la 22 (ver al final del texto en el Anexo 3) se muestran las gráficas de regresión lineal obtenidas por el equipo Rotor-Gene 6000 de ocho repeticiones de ensayos de PCR-TR donde se evalúan 8 diluciones decuples seriadas (1ng a 1×10^{-8} ng) cada una por triplicado, de la curva de cuantificación con el control positivo pPZ6. En estos ensayos el coeficiente de determinación (R^2) promedio fue de 0.99.

En la figura 7 se muestran juntos los 8 ensayos de cuantificación de las diferentes diluciones del plásmido pPZ6. En esta gráfica se puede apreciar la repetibilidad y el nivel de sensibilidad del ensayo de cuantificación por PCR-TR. Cada dilución está representada con un punto de color (ver Anexo 1). Podemos observar que las primeras 6 diluciones (del color morado al azul claro) los ensayos se comportan de una forma muy similar, sin embargo la séptima dilución (color verde claro) se localiza muy cercano al control negativo (color rojo), la octava dilución (1×10^{-8}) marcada en color amarillo oscuro se evaluó

únicamente en dos ensayos y los valores resultaron menores al control negativo.

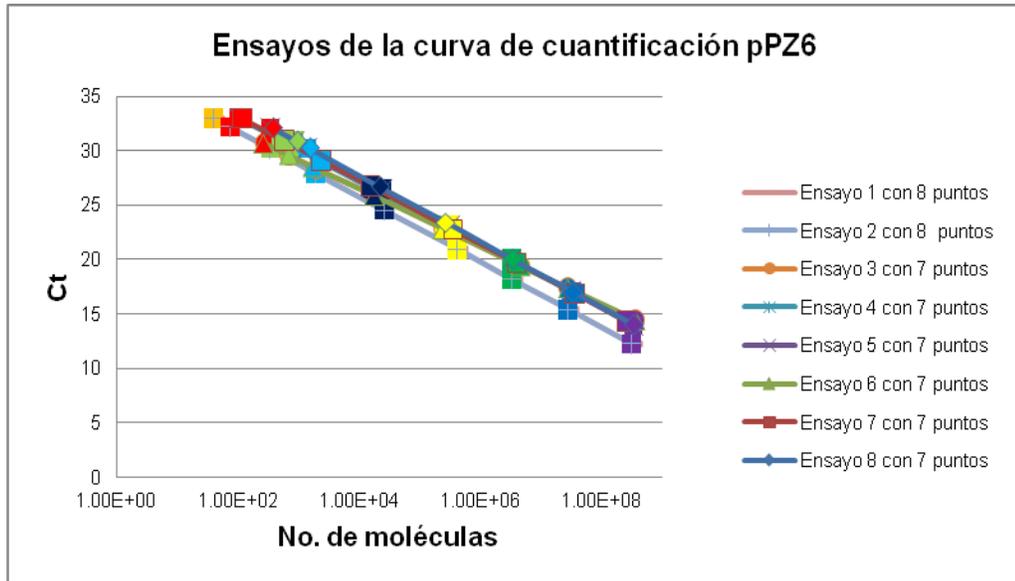


Figura 7. Gráfica de la repetibilidad de los 8 ensayos de la curva estándar de la cuantificación del plásmido pPZ6. Se muestra de derecha a izquierda las 8 diluciones de mayor a menor concentración. Las 6 primeras diluciones son las que se consideran como positivas, mientras que la séptima y la octava por su localización se descartan para el ensayo cuantitativo.

Con los valores de Ct y No de copias de los 8 ensayos con el ADN del pPZ6 se realizó el análisis estadístico, esto se presenta en el cuadro 10. Se muestra el promedio, la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (CV) y el número de moléculas calculadas. Estos mismos datos se grafican en la figura 8 y 9.

Cuadro 7. Análisis estadístico (promedio, desviación estándar (D.E.), coeficiente de variación (CV%) y número de moléculas calculadas) de 8 ensayos de PCR-TR, para cada uno de los puntos de la curva.

Diluciones del ADN estándar pPZ6	Promedio Ct	D.E. Ct	CV% Ct	No. de moléculas estimadas	No. de moléculas calculadas
1×10^{-1}	13.76	0.94	6.55	3.04×10^8	3.16×10^8
1×10^{-2}	16.68	0.81	4.67	3.04×10^7	3.10×10^7
1×10^{-3}	19.35	0.74	3.71	3.04×10^6	3.80×10^6
1×10^{-4}	22.44	0.96	4.13	3.04×10^5	3.24×10^5
1×10^{-5}	25.91	0.91	3.44	3.04×10^4	2.08×10^4
1×10^{-6}	28.93	0.92	3.13	3.04×10^3	1.91×10^3
1×10^{-7}	30.39	0.58	1.91	3.04×10^2	6.30×10^2
1×10^{-8}	32.97	-	-	3.04×10^1	4.08×10^1
C-	31.97	0.88	2.75	-	2.06×10^2

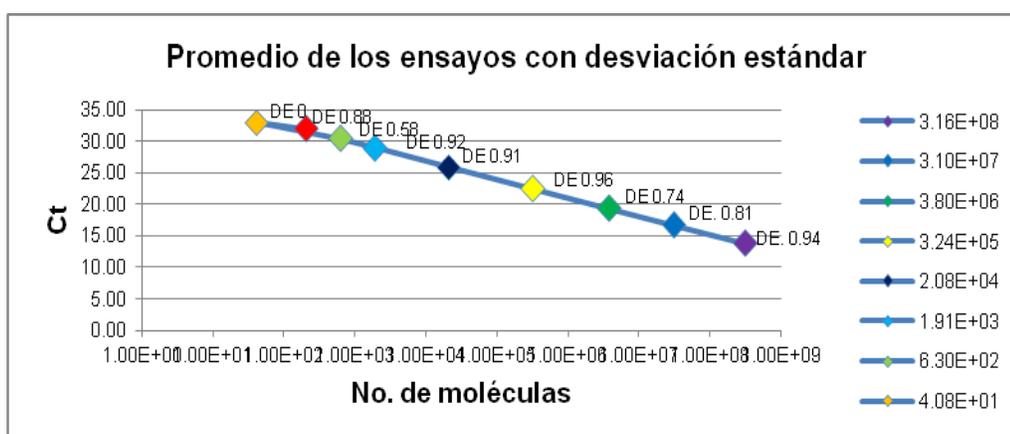


Figura 8. Promedio de los 8 ensayos de la curva estándar de cuantificación pPZ6. Se muestra en la parte superior la respectiva desviación estándar (DE) de cada una de las 8 diluciones y del control negativo.

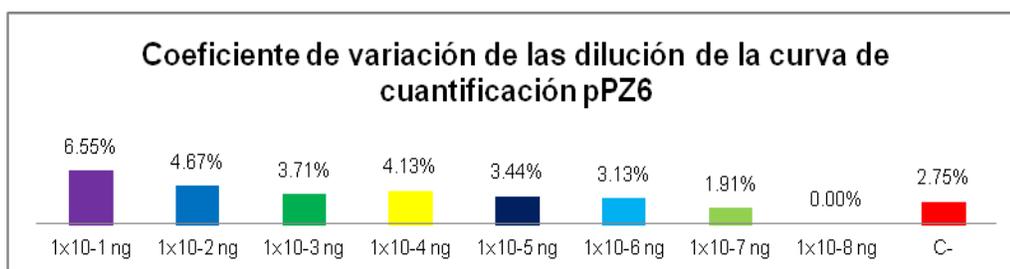


Figura 9. Gráfica del coeficiente de variación de las diluciones del plásmido pPZ6. Cada barra corresponde al CV dado en porcentaje de las diluciones de la curva de cuantificación.

En los ensayos se observó que en todas las diluciones la desviación estándar no es mayor a un ciclo y el coeficiente de desviación más alto fue de 6.55%. Con los datos anteriores y por el comportamiento de la gráfica mostrada en la figura 14 se estableció que para llevar a cabo un ensayo cuantitativo de RT-PCR-TR utilizando se requieren de seis diluciones decuples del plásmido pPZ6 a partir de 1 ng.

En estos ensayos se muestra que la cantidad mínima detectada y cuantificable del blanco de amplificación es de 1.91×10^3 moléculas

Determinación de la sensibilidad y repetibilidad de la cuantificación del virus de PRRS por RT-PCR-TR.

Para determinar la capacidad de la prueba de RT-PCR-TR para detectar y cuantificar el virus de PRRS se evaluaron 6 diluciones decuples seriadas del ARN viral obtenido de la vacuna Ingelvac® PRRS. Para la cuantificación se utilizaron 6 puntos de la curva de cuantificación con el ADN del plásmido pPZ6. Las determinaciones se realizaron por triplicado y en cuatro experimentos independientes.

Las gráficas de regresión lineal de cada experimento se muestran en las figuras de la 22 a la 25 (ver Anexo 4).

En la figura 10 se grafican juntos los 4 experimentos de cuantificación viral del PRRS. Cada dilución está representada con un punto de color (ver Anexo 2).

Se puede ver que las diluciones se comportan de manera similar, sin embargo la cuarta y última dilución (azul marino) en 3 de los 4 ensayos se localiza muy próxima o por abajo del negativo, por lo cual no se toma como positiva.

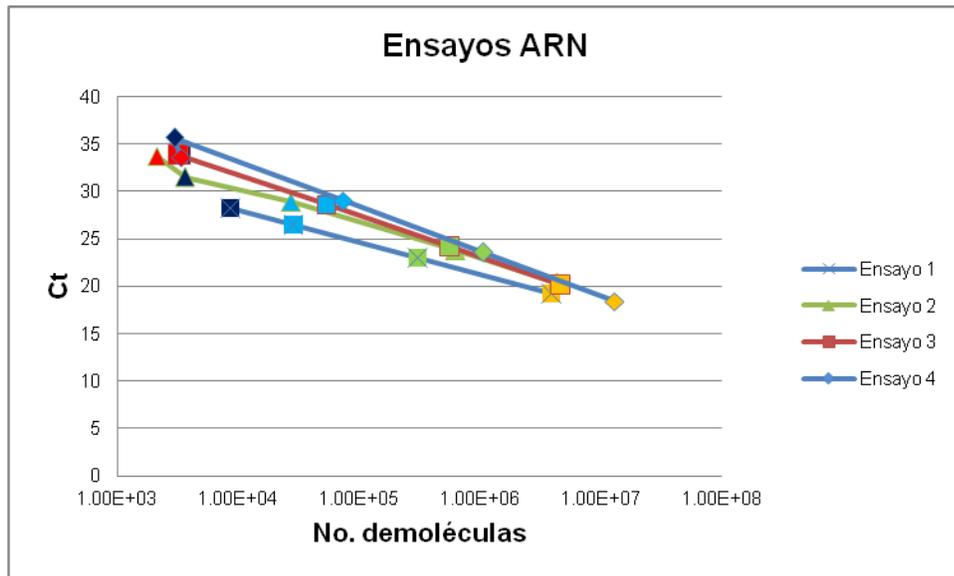


Figura 10. Gráfica de la repetibilidad de los 4 ensayos de la cuantificación del ARN vacunal. Se muestra de derecha a izquierda las 4 diluciones de mayor a menor concentración. Las 3 primeras diluciones son las que se consideran positivas, mientras que la cuarta por la cercanía con respecto al control negativo se descarta.

El cuadro 8 muestra el análisis estadístico de dichos ensayos, consistentes en el promedio, desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV%) y el promedio del número de moléculas calculadas. Dichos datos fueron graficados en las figuras 11 y 12.

Cuadro 8 Análisis estadístico (promedio, desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV%) y número de moléculas calculadas) de 4 ensayos de RT-PCR-TR evaluando la detección del ARN vacunal.

Diluciones del ADN estándar pPZ6	Promedio Ct	DE Ct	CV% Ct	No. de moléculas estimadas	No. de moléculas calculadas
1x10 ⁻¹	12.50	0.38	3.04	3.04x10 ⁸	3.17x10 ⁸
1x10 ⁻²	16.98	0.16	0.92	3.04x10 ⁷	2.50x10 ⁷
1x10 ⁻³	20.12	0.75	3.74	3.04x10 ⁶	3.84x10 ⁶
1x10 ⁻⁴	24.51	0.91	3.73	3.04x10 ⁵	3.24x10 ⁵
1x10 ⁻⁵	28.62	1.50	5.24	3.04x10 ⁴	2.56x10 ⁴
1x10 ⁻⁶	31.72	1.55	4.89	3.04x10 ³	4.24x10 ³
C-	33.73	0.18	0.52	-	2.91x10 ³

Diluciones del ARN	Promedio Ct	D.E. Ct	CV% Ct	No. de unidades virales DICT50%	No. de moléculas calculadas
1/10	19.55	0.90	4.58	4,964.5	3.17x10 ⁸
1/100	23.63	0.50	2.12	496.4	2.50x10 ⁷
1/1,000	28.24	1.19	4.21	49.6	3.84x10 ⁶
1/10,000	32.30	3.20	9.92	4.6	3.24x10 ⁵
C-	33.73	0.18	0.52	-	2.56x10 ⁴

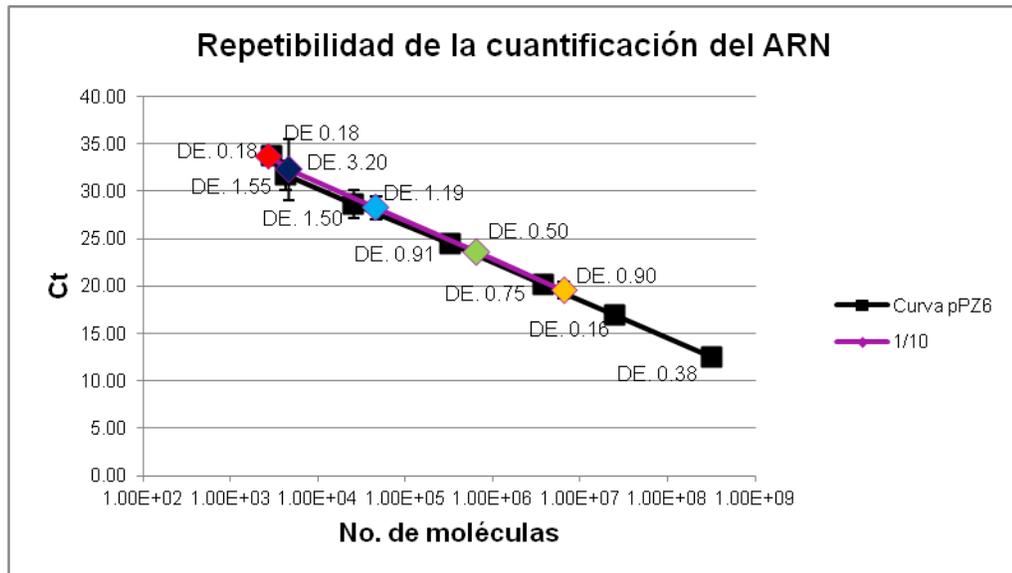


Figura 11. Gráfica del promedio de los 4 ensayos de la cuantificación del ARN viral y de la curva del ADN pPZ6. Se muestra la respectiva desviación estándar (DE) de cada una de las diluciones.

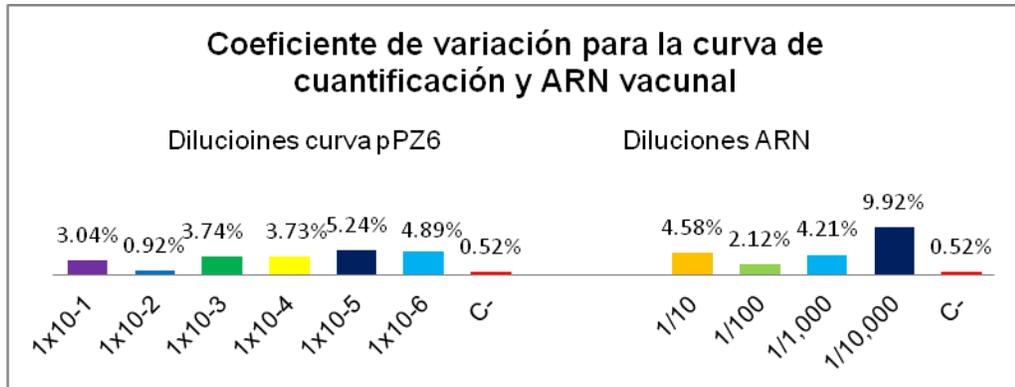


Figura 12. Gráfica del coeficiente de variación de las diluciones del plásmido pPZ6. Cada barra corresponde al CV dado en porcentaje de las diluciones de la curva de cuantificación.

En los ensayos apreciamos que el valor más alto de desviación estándar fue de 3.20 ciclos y el coeficiente de variación de 10.27%.

El análisis de los ensayos de RT-PCR-TR nos muestra un límite mínimo de detección de 10⁴ moléculas virales (3.86x10⁴) lo que equivale a 50 unidades virales DL50%, de acuerdo al título de la vacuna usada como fuente de ARN viral.

Determinación de la sensibilidad y repetibilidad de la RT-PCR y PCR anidada.

En las figuras 13 y 14 se muestra el límite de detección alcanzado de los fragmentos ORF5 y ORF7 por RT-PCR y PCR anidada a partir de ARN de la vacuna Ingelvac® PRSS.

Para ORF5 en punto final se observó amplificación sólo en la primera dilución del ADNc equivalente a 5,000 unidades virales, en cuanto a la

PCR anidada se logró observar mayor sensibilidad en la amplificación, detectándose hasta la cuarta dilución que corresponde a 5 unidades virales.

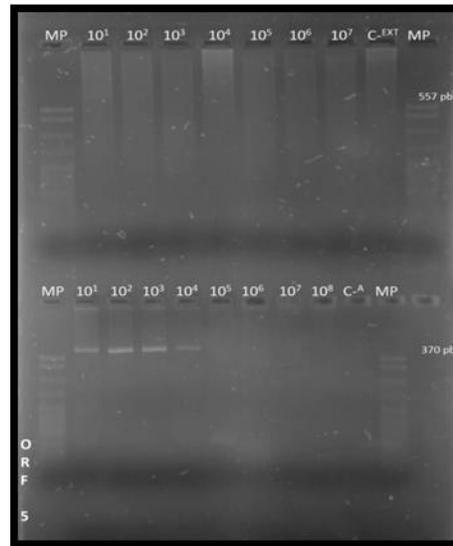


Figura 13 Sensibilidad del gen ORF5 por RT-PCR (parte superior) y PCR anidada (parte inferior). Electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml, marcador de peso molecular (MP) pBR 322/Mspl, en la parte superior se encuentran las diluciones del ADNc de la PCR externa y en la parte inferior con la PCR anidada.

En el caso de ORF7 por RT-PCR, únicamente amplificaron las dos primeras diluciones del ADNc equivalente a 500 unidades virales, mientras que para la PCR anidada se logró amplificar hasta la quinta dilución detectando 0.5 unidades virales.

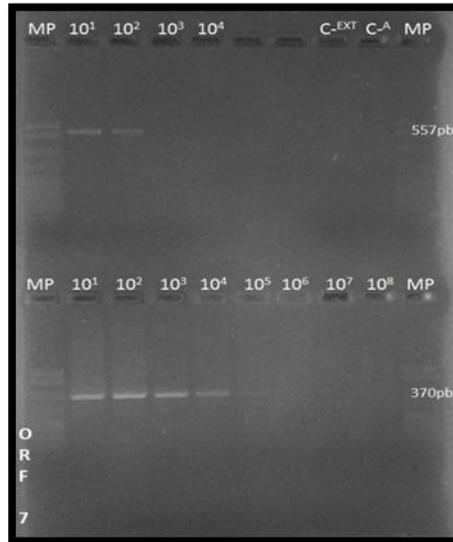


Figura 14. Sensibilidad del fragmento del ORF7 por RT-PCR (parte superior) y PCR anidada (parte inferior). Electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml, marcador de peso molecular (MP) pBR 322/Mspl en la parte superior se encuentran las diluciones del ADNc con la PCR externa y en la parte inferior con la PCR anidada.

Análisis comparativo de sensibilidad, costos y tiempos, entre RT-PCR, PCR anidada para ORF5 y ORF7 y RT-PCR-TR de la región UTR3´.

En el cuadro 9 se muestran los diferentes límites de sensibilidad obtenidos con los ensayos de RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR, observándose las diluciones que fueron positivas, el número de moléculas detectadas y las unidades virales a las que equivalen.

Cuadro 9. Límite de sensibilidad de los ensayos de RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR para el virus de PRRS.

Diluciones del ARN	RT-PCR ORF 5	PCR Anidada ORF5	RT-PCR ORF 7	PCR Anidada ORF7	qRT-PCR UTR3' (C _t)	No. de moléculas	Unidades virales
1x10 ⁻¹	+	+	+	+	19.19	5,730,000	4,964.5
1x10 ⁻²	-	+	+	+	22.88	559,000	496.4
1x10 ⁻³	-	+	-	+	27.60	38,600	49.64
1x10 ⁻⁴	-	+	-	+	-	3,810	4.96
1x10 ⁻⁵	-	-	-	+	-	-	0.49
1x10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	-	0.049
1x10 ⁻⁷	-	-	-	-	-	-	0.0049

Cada método tuvo su nivel de detección. Para la RT-PCR evaluando el ORF5 fue de 5,000 unidades virales, con la PCR anidada aumentó la sensibilidad hasta detectar 5 unidades virales. En la amplificación del fragmento correspondiente al ORF 7 fue más sensible, la RT-PCR detectó 500 unidades virales mientras que la PCR anidada amplificó la dilución correspondiente a 0.5 unidades virales. Para los ensayos de RT-PCR-TR se logró la amplificación y cuantificación de 50 unidades virales que equivalen a 38,600 copias virales.

En el cuadro 10 se observa el comparativo de los tiempos requeridos para llevar a cabo las diferentes metodologías. Para la RT-PCR-TR para el cual se requiere de 2 horas 30 minutos, para la RT-PCR y PCR anidada se emplea un mínimo de 6 horas 50 minutos, cabe mencionar que dentro del tiempo estimado no se toma en cuenta la purificación del ácido nucleico.

Cuadro 10. Tiempo requerido para realizar los ensayos de RT-PCR-TR, RT-PCR y PCR anidada.

Ensayos	RT-PCR-TR	RT-PCR y PCR anidada
RT	30 min.	90 min.
PCR	120 min.	120 min.
PCR anidada	-	120 min.
Electroforesis	-	60 min.
Tiempo	150 min.	390 min.

El costo por reacción de los consumibles empleados para el ensayo de RT-PCR-TR se resume en el cuadro 11, siendo de \$9.73.

En el cuadro 12 se muestran los costos para las técnicas de RT-PCR y PCR anidada los cuales se estimaron en \$18.03.

Cuadro 11. Costo por reacción de los consumibles para el ensayo de RT-PCR TR

Reactivo	Inversión	Costo por reacción
Inicadores y sondas (control interno y PRRS)	\$4,874.2	\$0.10
Amplificasa® (MgCl, buffer y polimerasa)	\$1,300.00	\$5.20
dNTP's	\$1,000.00	\$2.00
RT® Fermentas	\$4,000.00	\$3.20
Inhibidor	\$800.00	\$1.28
Otros (tubos y agua DEPC)	\$6,000.00	\$0.55
Total	\$17,974.20	\$9.73

Cuadro 12. Costo por reacción de los consumibles para el ensayo de RT-PCR y PCR anidada.

Ensayo	Reactivo	Inversión	Precio	Costo por ensayo
RT	Iniciadores	-	\$0.08	\$6.71
	RT® Fermentas	\$4,000.00	\$3.20	
	Inhibidor	\$800.00	\$1.28	
	dNTP's		\$1.60	
PCR	Iniciadores	\$416.00	\$0.01	\$7.21
	Amplificasa® (MgCl, buffer y polimerasa)	\$1,300.00	\$5.20	
	dNTP's	\$1,000.00	\$2.00	
PCR anidada	Iniciadores	\$208.00	\$0.01	\$4.61
	Amplificasa® (MgCl, buffer y polimerasa)	\$1,300.00	\$2.60	
	dNTP's	\$1,000.00	\$2.00	
	Otros (tubos y agua DEPC)	\$6,000.00	\$1.65	
Total		\$16,232.00	\$18.03	

Los consumibles y costos generados para la construcción del control positivo pPZ6 fueron de \$918.54 y se muestran en el cuadro 13.

Cuadro 13. Costo de los consumibles para la construcción del control positivo pPZ6.

	Inversión	Costo del control positivo pPZ6
Transformación bacteriana	\$9,100.00	\$316.36
Minipreparación	\$10,150.00	\$32.58
Purificación	\$2,200.00	\$22.00
Cuantificación por PicoGreen®	\$8,540.00	\$4.27
Secuenciación	-	\$300
Total		\$918.54

En los cuadros 14 y 15 se presenta el costo para realizar el diagnóstico del virus de PRRS por las técnicas de RT-PCR-TR cuantitativo y RT-PCR-TR, así como la RT-PCR y PCR anidada.

Cuadro 14. Costos del diagnóstico de PRRS por RT-PCR-TR cuantitativo (lado izquierdo) y RT-PCR-TR (lado derecho).

Ensayo	Costo por diagnóstico	
	qRT-PCR	RT-PCR-TR
Extracción de ARN	\$29.70	\$29.70
PCR (por duplicado 6 puntos de la curva y C-)	\$72.62	-
RT-PCR (por duplicado muestra y C-)	\$38.94	\$38.94
Total	\$141.26	\$68.64

Cuadro 15. Costos del diagnóstico de PRRS por RT-PCR y PCR anidada.

Ensayo	Costo por reacción
Extracción de ARN	\$29.70
RT	\$6.71
PCR (por duplicado muestra y C-)	\$7.21
PCR anidada (por duplicado muestra y C-)	\$4.61
Electroforesis	\$10.59
Total	\$58.82

El costo del diagnóstico cuantitativo de una muestra por RT-PCR-TR es de \$141.26; mientras que solo el diagnóstico por RT-PCR-TR tiene un costo de \$68.64, un valor muy cercano al del diagnóstico por RT-PCR y PCR anidada que es de \$58.82.

DISCUSIÓN

En este trabajo se estandarizaron y compararon tres técnicas de diagnóstico molecular (RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR-TR) para determinar su sensibilidad, costos y aplicaciones. La región UTR 3' empleada para el diagnóstico por RT-PCR-TR y el ORF 7 utilizada para la RT-PCR y PCR anidada son regiones muy conservadas en la mayoría de los aislados, por lo que hay menos riesgo de falsos negativos.²⁵ Mientras que el ORF 5 analizado por RT-PCR y PCR anidada es más variable y puede llegar a no ser amplificado, sin embargo este gen es utilizado para determinar la diversidad génica de las cepas.^{26,27}

Para el análisis de la sensibilidad y repetibilidad de la cuantificación por PCR en tiempo real, empleando el ADN del plásmido pPZ6 en la curva estándar de cuantificación, se usaron 6 diluciones decuples seriadas. En general, en las curvas de cuantificación se encontró un coeficiente de correlación (R^2) promedio de 0.99, indicando una buena linealidad, es decir, que existe una relación lineal entre la fluorescencia emitida y el número de moléculas iniciales en la amplificación.^{28,29} El rango dinámico de cuantificación en la curva estándar fue en el límite inferior establecido a de 4,240 moléculas (4.24×10^3 moléculas) y en los ensayos de RT-PCR-TR la sensibilidad fue de 38,000 moléculas (3.8×10^6 moléculas) que equivale a 50 unidades virales.

Se conocen diversos factores que pueden afectar la reacción de RT-PCR; una muy importantes es la integridad del material genético, en este caso del RNA, igualmente la eficiencia de la purificación de este. Por otro lado la presencia de inhibidores en la muestra.^{16,18,30} Aunado a esto, se ha documentado que la

sensibilidad de los ensayos de la RT-PCR depende si se realiza en uno o dos pasos. ^{28,29} En dos pasos, quiere decir que primero se efectúa la RT y después la PCR. Los ensayos de dos pasos presentan mayor grado de sensibilidad pero incrementan el tiempo requerido para el análisis de las muestras. Mientras que la RT-PCR en un paso se reduce la sensibilidad del ensayo y con ello el tiempo empleado. En los ensayos de RT-PCR-TR, que son de un solo paso se detectaron hasta 50 unidades virales, sin embargo en la RT-PCR en dos pasos y su posterior PCR anidada, en el caso del ORF5 se detectaron hasta 5 unidades virales, mientras que para el ORF7 se logró la detección de 0.5 unidades virales.

Un problema en la PCR anidada es la posibilidad de obtener falsos positivos debido a contaminación. Esto lo pudimos observar en muchos de nuestros ensayos (datos no mostrados).

De los experimentos de RT-PCR- anidada, se intentó inicialmente la amplificar usando RT-PCR en un solo paso, pero cuando se efectuaba la PCR anidada se observaron amplificaciones inespecíficas, sin observar el efecto de dilución. Este problema de contaminación no se observó en los ensayos de RT-PCR en tiempo real, los cuales son ensayos de un solo paso, aunque la sensibilidad sí se vio afectada, ya que se obtuvo un límite de detección de 38,000 moléculas (3.8×10^4 moléculas) que equivalen a 50 unidades virales.

Cabe mencionar la importancia de trabajar con ARN recién extraído, ya que este es muy lábil y puede degradar rápidamente. Notamos en varias ocasiones que después de almacenar el ARN a -70° para su posterior uso, la

cantidad detectada se reducía en ensayos subsecuentes. Esto pudimos evitarlo añadiendo inhibidor de RNAsas (Fermentas®, catálogo EO0381).

En lo que se refiere a los consumibles utilizados, los costos por reacción que generan los ensayos de RT-PCR-TR, RT-PCR y PCR anidada son de \$9.73, \$13.82 y \$28.16 respectivamente. El costo para el diagnóstico del PRRSV tomando en cuenta la extracción del ácido nucleico, los controles negativos y procesos post-PCR, son para la RT-PCR-TR cuantitativa de \$141.26, para la RT-PCR-TR no cuantitativa de \$68.64 y para la RT-PCR y PCR anidada de \$58.82. En el mercado sólo existe un kit para el diagnóstico de PRRSV por tiempo real, el costo es de \$23,800.00 para 96 reacciones (\$247.91 pesos/reacción), el tiempo de entrega es de 30 a 45 días y no cuenta con un control positivo de cuantificación.

El tiempo requerido para el desarrollo de la RT-PCR-TR es de 2 horas 30 minutos, mientras que para los ensayos de RT-PCR y PCR anidada se estimó un mínimo de 6 horas 50 minutos, estos cálculos se realizaron sin tomar en cuenta la extracción del ácido nucleico, proceso que llega a ser de 2 horas 30 minutos por el método de fenol ácido. Se debe tomar en cuenta que el aislamiento viral es considerado la prueba de oro para el diagnóstico de muchas enfermedades virales³¹, sin embargo esta técnica es laboriosa y de alto costo, requiriéndose una infraestructura de cultivo de tejidos³². En la actualidad los métodos de diagnóstico molecular como la PCR están reemplazando al aislamiento vírico debido a que poseen una mayor sensibilidad, rápido diagnóstico y no requieren la preservación en la muestra de virus replicables los que son susceptibles a la inactivación, ni de cultivos

celulares o medios de mantenimiento que resultan costosos, aunado a esto el aislamiento tarda varias semanas para poder completar el diagnóstico³³.

La elección del tipo de técnica de diagnóstico para el virus del PRRS va depender de la decisión de si se desea un diagnóstico cualitativo o cuantitativo. También si se necesita recuperar el producto amplificado para estudios posteriores como sería de variabilidad genética.

En general se puede proponer para estudios masivos de diagnóstico, en los cuales se emplean pools de muestras, efectuar el diagnóstico por RT-PCR-TR. Esto es más rápido y económico, aunque se tendría una sensibilidad moderada. Si se desea además estudiar la variabilidad genética del virus, en las muestras positivas por RT-PCR-TP se pueden amplificar por RT-PCR anidada.

CONCLUSIONES:

En este trabajo se desarrolló un ensayo de RT-PCR-TR para el diagnóstico y cuantificación del virus de PRRS. Para la determinación del número de copias virales, se construyó un control estándar de cuantificación del ensayo mediante la clonación del producto de amplificación.

Este método se comparó con las técnicas de RT-PCR punto final y PCR anidada en los niveles de sensibilidad y repetibilidad. Se evaluaron los costos y tiempos de los procesos para cada uno de los métodos de detección del virus de PRRS.

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

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

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

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

Anexo 1. Diluciones decuples seriadas del plásmido pPZ6.

En el siguiente cuadro se muestran las diluciones del plásmido pPZ6 a partir de 1 ng hasta 1×10^{-8} ng con el número de moléculas correspondientes a cada dilución, utilizadas para la estandarización de la curva de cuantificación para el diagnóstico RT-PCR-TR.

Color	Dilución	Cantidad ng	Número de moléculas
■	1	1×10^{-1} ng	3.04×10^{-8}
■	2	1×10^{-2} ng	3.04×10^{-7}
■	3	1×10^{-3} ng	3.04×10^{-6}
■	4	1×10^{-4} ng	3.04×10^{-5}
■	5	1×10^{-5} ng	3.04×10^{-4}
■	6	1×10^{-6} ng	3.04×10^{-3}
■	7	1×10^{-7} ng	3.04×10^{-2}
■	8	1×10^{-8} ng	3.04×10^{-1}
■	C-	-	-

Anexo 2. Diluciones decuples seriadas del ARN vacunal de virus de PRRS.

Se muestra el número de copias virales de ARN para las diferentes diluciones de acuerdo al título de la vacuna Ingelvac® PRRS MLV DICT50% empleada en los experimentos.

Color	Dilución	Copias virales
■	1:10	5,000
■	1:100	500
■	1:1,000	50
■	1:10,000	5
■	1:100,000	0.5
■	1:1,000,000	0.005
■	C-	-

Anexo 3. Gráficas de regresión lineal correspondiente a la estandarización de la curva de cuantificación del plásmido pPZ6

Gráficas obtenidas del equipo Rotor-Gene 6000 de las ocho repeticiones de ensayos de PCR-TR donde se evalúa la cuantificación y repetibilidad del control positivo pPZ6.

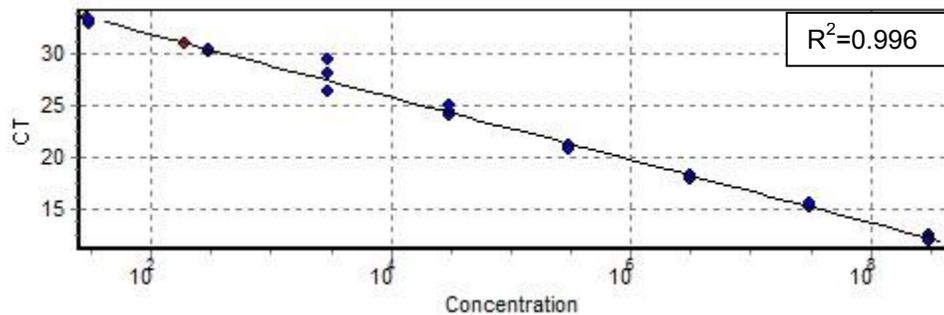


Figura 15. Ensayo 1, curva estándar de la cuantificación del plásmido pPZ6. Se muestra la correlación (R^2) de 0.99613 de la cuantificación (eje de las X) con el ciclo de detección (Ct) de fluorescencia (eje de las Y) y la localización de ADN plasmídico de las 8 diluciones (puntos azules) y el control negativo (puntos rojos).

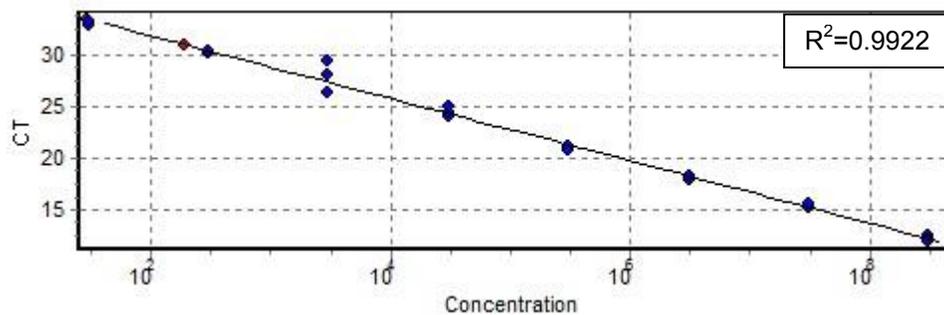


Figura 16. Ensayo 2, curva estándar de la cuantificación del plásmido pPZ6. Se muestra la correlación (R^2) de 0.99227 de la cuantificación (eje de las X) con el ciclo de detección (Ct) de fluorescencia (eje de las Y) y la localización de ADN plasmídico de las 8 diluciones (puntos azules) y el control negativo (puntos rojos).

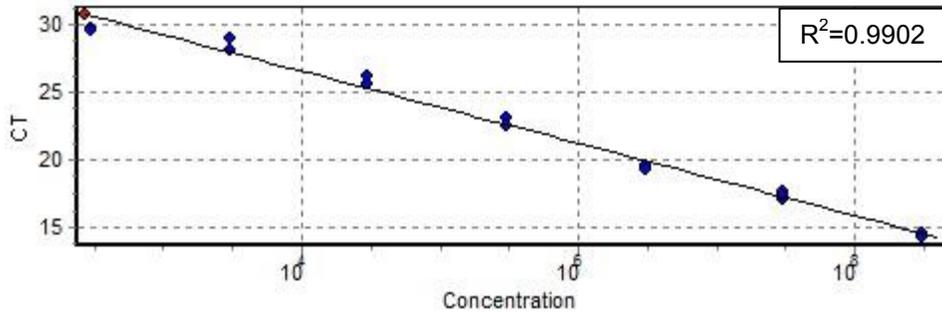


Figura 17. Ensayo 3, curva estándar de la cuantificación del plásmido pPZ6. Se muestra la correlación (R^2) de 0.99020 de la cuantificación (eje de las X) con el ciclo de detección (Ct) de fluorescencia (eje de las Y) y la localización de ADN plasmídico de las 8 diluciones (puntos azules) y el control negativo (puntos rojos).

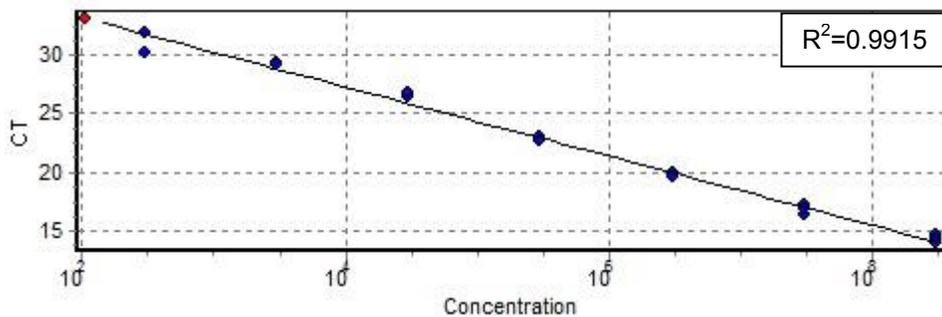


Figura 18. Ensayo 4, curva estándar de la cuantificación del plásmido pPZ6. Se muestra la correlación (R^2) de 0.99151 de la cuantificación (eje de las X) con el ciclo de detección (Ct) de fluorescencia (eje de las Y) y la localización de ADN plasmídico de las 8 diluciones (puntos azules) y el control negativo (puntos rojos).

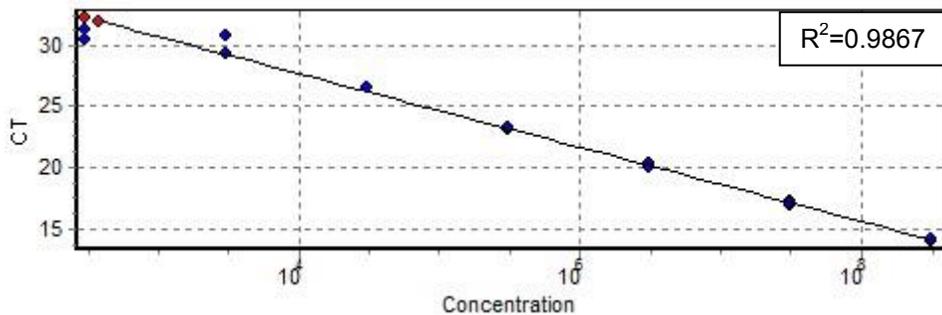


Figura 19. Ensayo 5, curva estándar de la cuantificación del plásmido pPZ6. Se muestra la correlación (R^2) de 0.98671 de la cuantificación (eje de las X) con el ciclo de detección (Ct) de fluorescencia (eje de las Y) y la localización de ADN plasmídico de las 8 diluciones (puntos azules) y el control negativo (puntos rojos).

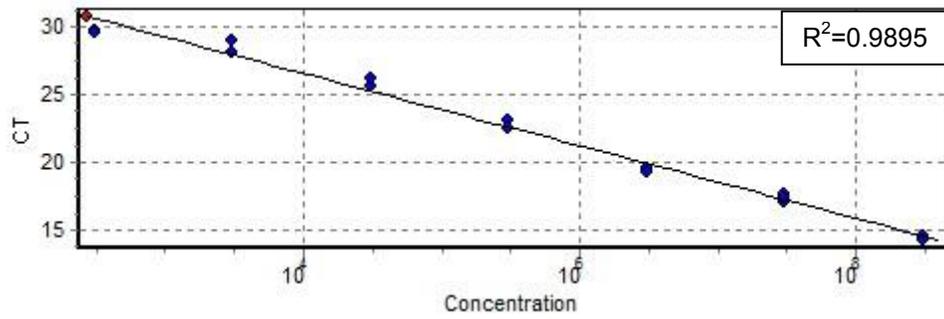


Figura 20. Ensayo 6, curva estándar de la cuantificación del plásmido pPZ6. Se muestra la correlación (R^2) de 0.98952 de la cuantificación (eje de las X) con el ciclo de detección (Ct) de fluorescencia (eje de las Y) y la localización de ADN plasmídico de las 8 diluciones (puntos azules) y el control negativo (puntos rojos).

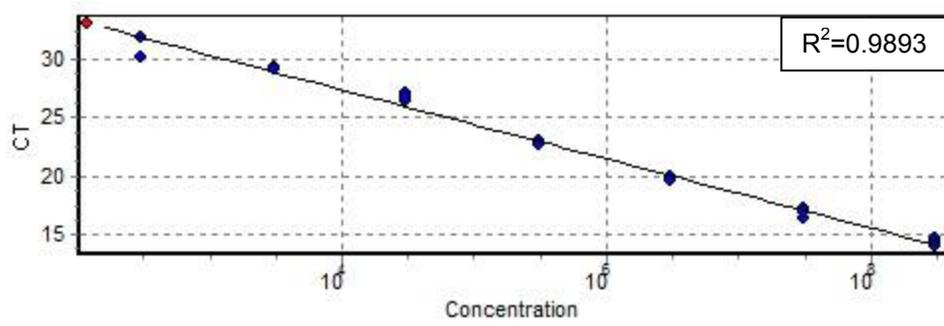


Figura 21. Ensayo 7, curva estándar de la cuantificación del plásmido pPZ6. Se muestra la correlación (R^2) de 0.98939 de la cuantificación (eje de las X) con el ciclo de detección (Ct) de fluorescencia (eje de las Y) y la localización de ADN plasmídico de las 8 diluciones (puntos azules) y el control negativo (puntos rojos).

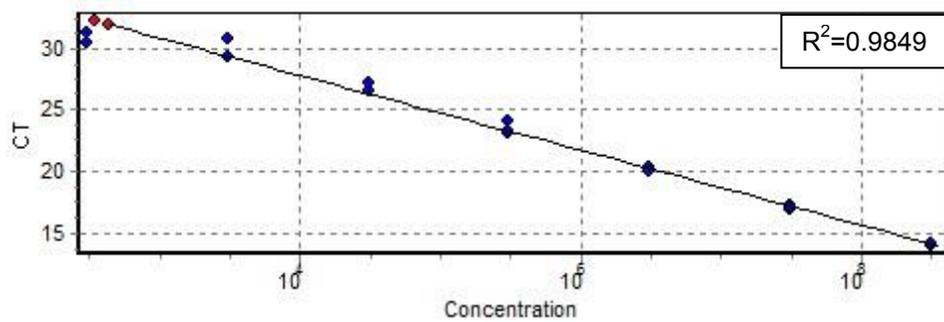


Figura 22. Ensayo 8, curva estándar de la cuantificación del plásmido pPZ6. Se muestra la correlación (R^2) de 0.98497 de la cuantificación (eje de las X) con el ciclo de detección (Ct) de fluorescencia (eje de las Y) y la localización de ADN plasmídico de las 8 diluciones (puntos azules) y el control negativo (puntos rojos).

Anexo 4. Gráficas de regresión lineal correspondiente a las repeticiones de los ensayos de RT-PCR-TR evaluando el ARN vacunal.

Gráficas obtenidas del equipo Rotor-Gene 6000 de las cuatro repeticiones de ensayos de RT-PCR-TR que evalúa la cuantificación y repetibilidad del ARN vacunal.

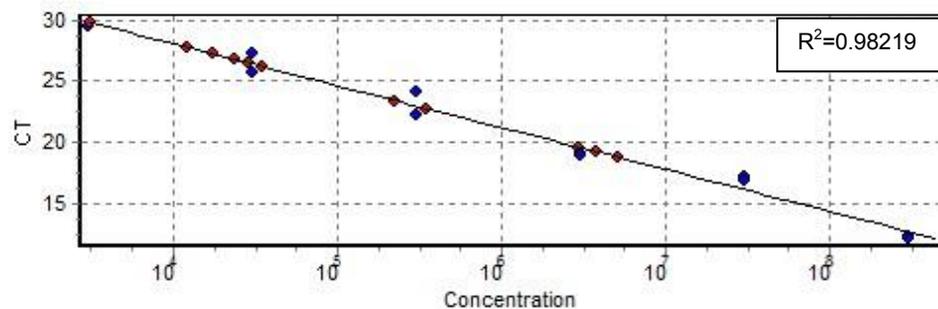


Figura 22. Ensayo 1, Cuantificación del ARN vacunal. Se muestra una correlación (R^2) de 0.98219 de la cuantificación (eje de las X) con el ciclo de detección (Ct) de fluorescencia (eje de las Y). La curva de cuantificación se aprecia con puntos azules y las diluciones de ARN y el control negativo en puntos rojos. El límite de detección del ARN fue de 10^4 moléculas (2.86×10^4) equivalente a 49.64 cadenas de ARN.

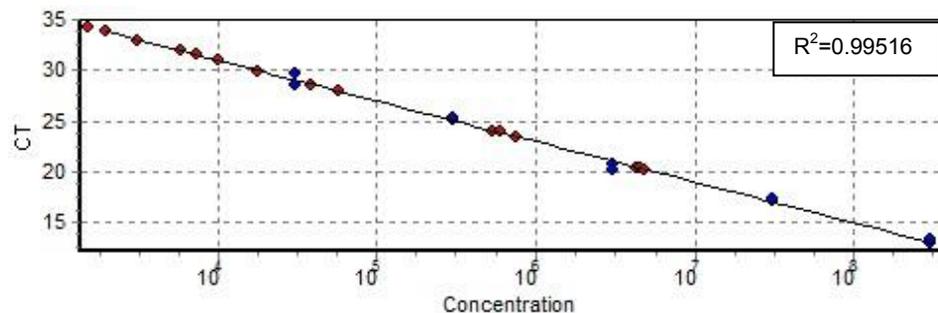


Figura 23. Ensayo 2, Cuantificación del ARN vacunal. Se muestra una correlación (R^2) de 0.99516 de la cuantificación (eje de las X) con el ciclo de detección (Ct) de fluorescencia (eje de las Y). La curva de cuantificación se aprecia con puntos azules y las diluciones de ARN y el control negativo en puntos rojos. El límite de detección del ARN fue de 10^4 moléculas (2.67×10^4) equivalente a 49.64 cadenas de ARN.

Bibliografía

- ¹ Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory síndrome virus on United States Pork Producers. J Swine Health Prod.2013; 21(2):72-84.
- ²Batista L. Impacto económico de la enfermedad de PRRS en granjas porcinas, Memorias del segundo Simposio Internacional de PRRS en México; octubre 2013. FMVZ-UNAM. México, DF.
- ³ Zimmerman J. Historical Overview of PRRS Virus. Compendium Producer Edition. 2003.
- ⁴ Done SH, Paton DJ, White EC. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS): a review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspect. Br vet J. 1996; 152,2.
- ⁵ <https://online.zoetis.com/es/es/Paginas/ES.aspx> [página de inicio]. Zoetis España, 2013. [actualizado 1 Ago 2013, citado 1 Ago 2013] disponible en: <https://online.zoetis.com/ES/ES/Condiciones/Paginas/VSRRP.aspx>
- ⁶Batista L. Advancing PRSS area regional control in state of Sonora, México. Proceedings of dthe 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. 2010.
- ⁷ Becerra A. Situación sanitaria y de bioseguridad en Jalisco. Simposio Internacional de México 2014
- ⁸ Reveolo CA. Prevalencia y factores de riesgo asociados con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino en sementales de granjas porcinas en el sureste de México. Revista Científica FCV-LUZ 2010; vol, XX N°1,17-23,
- ⁹ <http://pigtecnia.wikispaces.com/> San Francisco, California, 2005. [actualizado 4 Ago 2013, citado 4 Ago 2013] disponible en: <http://pigtecnia.wikispaces.com/IMPACTO+EN+LA+PRODUCCI%C3%93N+Y+ECON%C3%93MICO>
- ¹⁰ Cho JG, De esa. Porcine reproductive and respiratory síndrome virus. Animal Science/Veterinary Medicine Building 2006; 655-662.
- ¹¹ Wensvoort G, Meulenbergg JJM, Murtaugh M, Benfield D, Nelson EA, Conzelmann K, et al. The porcine reproductive and respiratory síndrome. Vet. Biotechnology Newsletter. 1993; vol 3, 113-120.

-
- ¹² <http://www.porcilis-prrs.com/> The Netherlands 2009 [actualizado 11 mayo 2015, citado 11 mayo 2015] disponible en: <http://www.porcilis-prrs.com/microbiology-prrsv-structure.asp>
- ¹³ Rossow KD. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet Phatol* 1998; 35:1.
- ¹⁴ Organización Mundial de Sanidad Animal. PRRS: the disease, its diagnosis, prevention and control. París 2008.
- ¹⁵ Organización Mundial de Sanidad Animal. Síndrome digenésico y respiratorio porcino. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008.
- ¹⁶ Hennins JC, Faaber KS, Murtaugh MP, Nelson EA, Roof MB, et al. Porcine Reproductive and respiratory Syndrome (PRRS) diagnostics: Interpretation and limitations. *J Swine Health Prod.* 2002; 10(5):213-218.
- ¹⁷ Organización Mundial de Sanidad Animal. Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos 2006.
- ¹⁸ Heid C., Stevens J., Livak K., Williams M. Real time quantitative PCR. *Cold Genome Research* 2015, 986-994.
- ¹⁹ Microbial SL. Sistemas de detección de patógenos por PRC a Tiempo Real. Girona, 2009.
- ²⁰ Steven B. Kleiboeker¹, Susan K. Schommer, Sang-Myeong Lee, Sandy Watkins, Wayne Chittick, Dale Polson. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *J Vet Diagn Invest* 2005;17:165-170.
- ²¹ Di Trani L, Bendini B, Donatelli I, Campitelli L, Chiapini B, De Marco MA, Delogu M, Buonavoglia C, Vaccari G. A sensitive one-step real time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. *BMC Infectious Disease* 2006.
- ²² Boyle J, Lew A. an inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics* 1995.
- ²³ Oender K., Hudsberger H., Hintner H., Bauer J. W., PicoGreen dsDNA Cuantitation with the Beckman Coulter DTX 800/800 Multimode Detector.

-
- ²⁴ www.idtdna.com/site Coralville, USA [actualizado 14 Agosto 2014, citado 14 Ago 2014] disponible en: <http://eu.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/pipet-tips/decoded/2013/10/21/calculations-converting-from-nanograms-to-copy-number>
- ²⁵ Yin Y., Changlong P., Huochun L., Zuzhang Y., Jiaqi Lu., et al. Conserved nucleotides in the terminus of the 3' UTR region are important for the replication and infectivity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 2013; 158: 1719-1732.
- ²⁶ Wootton S., Yoo D., Rogan D., Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) isolate. *Springer-Verlag* 2000; 145: 2297-2323.
- ²⁷ Kim W., Kim J., Cha S., Wua W., Cooper V., Evans R., et al. Significance of genetic variation of PRRSV ORF5 in virus neutralization and molecular determinants corresponding to cross neutralization among PRRS viruses. *Veterinary Microbiology* 162, 2013; 10-22.
- ²⁸ Agilent Technologies, Inc. Introduction to quantitative PCR. Methods and application guide. 2004; IN70200-00: 9-35
- ²⁹ Tevfik MD. Real time PCR. 2nd ed. New York: Taylor & Francis Group, 2007.
- ³⁰ Fleige S., Pfaffl M. RNA integrity and effect on the real time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 2006; 126-139.
- ³¹ Leland D., Ginocchio C. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clinical Microbiology Reviews* 2007, vol. 20, 49-78.
- ³² Spagnuolo M., Walker I., McNeilly F., Calvert V., Graham D., Burns K., et al. The reverse transcription polymerase chain reaction for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome: Comparison with virus isolation and serology. *Veterinary Microbiology* 1998, 62; 207-215.
- ³³ Organización Mundial de Sanidad Animal. Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Capítulo 1.1.3; 2006.