

# DIAGNÓSTICO DE PROBLEMAS REPRODUCTIVOS PORCINOS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

A.A. Benito, J.L. Arnal, J.D. Serrano, M. Borobia y L. Pradas\*. 2014. PV ALBEITAR 31/2014.

\*Exopol Autovacunas y Diagnóstico. [exopol@exopol.com](mailto:exopol@exopol.com)  
[www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Volver a: [Enf. infecciosas de los porcinos](#)

## INTRODUCCIÓN

En este trabajo se presentan los resultados de un panel reproductivo que incluye la identificación de leptospira patógena, *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydia suis*, circovirus porcino tipo 2, parvovirus porcino y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino mediante PCR en tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la identificación sensible y específica de una secuencia determinada de ADN o ARN mediante la amplificación de una región concreta del genoma de cualquier organismo. Durante los últimos años esta técnica ha sido optimizada como herramienta de diagnóstico de las principales enfermedades infecciosas y parasitarias de interés veterinario en un número creciente de laboratorios clínicos. Actualmente, una variante de esta técnica denominada PCR en tiempo real (qPCR) ha cobrado relevancia debido a su mejor especificidad, sensibilidad y reproducibilidad que la PCR convencional. El uso de la qPCR ha permitido conseguir límites mínimos de detección entre 2 y 100 copias por reacción, disminuir el riesgo de contaminación y reducir el tiempo del análisis, además de permitir la cuantificación absoluta o relativa del patógeno evaluado. Esta técnica también posibilita la identificación simultánea de distintos patógenos en una única muestra mediante la utilización de diferentes fluoróforos y filtros de detección [1, 2].

Para llevar a cabo un análisis de qPCR es necesario la extracción previa de los ácidos nucleicos a partir de matrices orgánicas seleccionadas, seguido de la posterior amplificación y detección de las secuencias diana. El producto amplificado se detecta en tiempo real a medida que la reacción se está verificando y una gráfica que representa los niveles de fluorescencia a lo largo de los ciclos de amplificación permite la posterior interpretación de los resultados. El Ciclo *threshold* (Cq), definido como el ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa el valor umbral, es indicativo del número inicial de copias diana, y es menor cuanto mayor es dicho número de copias. De este modo, con el uso de un control positivo de concentración conocida, la qPCR permite la identificación del agente así como su cuantificación absoluta o relativa [3].

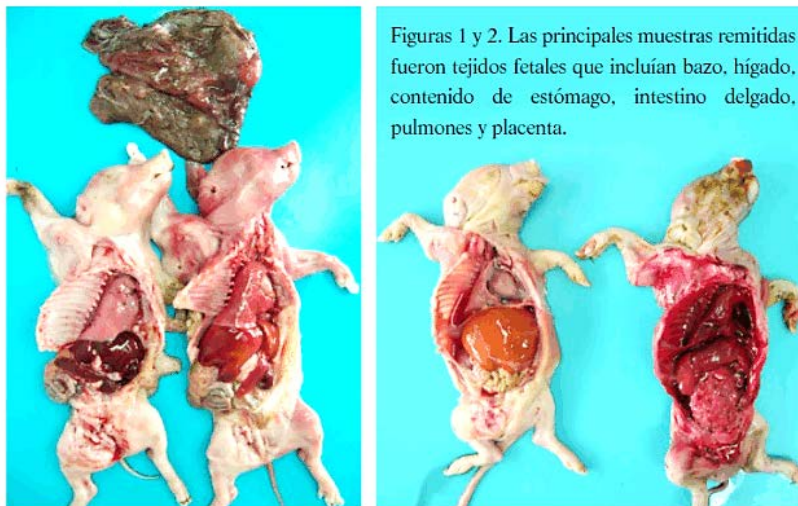
Recientemente, Exopol ha diseñado y validado más de 50 ensayos de qPCR para el diagnóstico de las principales enfermedades virales, bacterianas y parasitarias de relevancia en el sector veterinario [3, 4, 5, 6, 7 y 8]. Estos ensayos presentan un innovador formato en el que todos los componentes de la reacción se estabilizan en una placa de 96 pocillos, lo que permite el uso rutinario de esta técnica de manera sencilla, rápida y automatizable. Todos estos ensayos se han diseñado para ser ejecutados simultáneamente, lo cual favorece la evaluación de “paneles multiparamétricos” en una misma muestra [9, 10 y 11]. El uso de estos paneles rentabiliza el diagnóstico de los problemas infecciosos en los cuales es necesaria la detección de múltiples patógenos de forma rápida y sencilla, aportando mayor cantidad de información a nuestros usuarios.

En el sector porcino, Exopol realiza la evaluación de un panel reproductivo que incluye la identificación de leptospira patógena [4], *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydia suis*, circovirus porcino tipo 2 (PCV2), parvovirus porcino (PPV) y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSv). En este estudio se presentan los resultados obtenidos en los últimos meses.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Muestras evaluadas

Se analizaron un total de 82 casos de abortos porcinos con sospecha de problemas reproductivos de etiología infecciosa y remitidos a nuestro laboratorio desde septiembre de 2012 hasta febrero de 2014. 48 casos provenían de 18 provincias de España, 29 casos de Francia y 5 casos de Portugal. Para economizar y simplificar las analíticas, las muestras de cada caso fueron agrupadas en pools con un máximo de cinco órganos en total y procedentes de no más de dos fetos (*figuras 1 y 2*).



Figuras 1 y 2. Las principales muestras remitidas fueron tejidos fetales que incluían bazo, hígado, contenido de estómago, intestino delgado, pulmones y placenta.

### Extracción de ácidos nucleicos

Partiendo de un *pool* de 25 mg de tejidos, el cual fue sometido a homogenización para obtener una suspensión celular, se procedió a la extracción automatizada de los ácidos nucleicos utilizando el dispositivo *Labturbo 36 Compact System C3620* y siguiendo los protocolos *Genomic mini Kit LGD500* y *Total RNA mini kit LTR600* para la obtención de ADN y ARN, respectivamente.

### Ensayos dúplex de qPCR en formato estabilizado

Un total de seis ensayos de qPCR, previamente diseñados y validados en nuestro laboratorio, conformaron el panel reproductivo porcino, que incluía la identificación de los siguientes agentes: leptospiras patógenas, *C. abortus*, *C. suis*, PCV2, PPV, y PRRSv. La principal innovación de estos ensayos fue el uso de un nuevo formato de qPCR, en el cual todos los reactivos necesarios se encontraban predispensados y estabilizados en cada pocillo de una placa, permitiendo una rápida y sencilla preparación de la analítica.

Estos ensayos dúplex qPCR detectaban específicamente el patógeno en canal FAM, así como un control endógeno (CE) en canal HEX. El uso de este CE permitió verificar el correcto funcionamiento del proceso, desde la extracción hasta la amplificación [12]. Adicionalmente, cada ensayo disponía de un correspondiente control positivo sintético en una concentración conocida facultando la cuantificación absoluta o relativa de los resultados positivos [3].

La preparación de la reacción de qPCR fue similar en todos los ensayos y consistió únicamente en la adición de 10  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y 5  $\mu$ l del ácido nucleico correspondiente (ADN o ARN) en cada pocillo. Se utilizó un único protocolo térmico para los patógenos de ADN y otro para el ARN [4 y 12]. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador *StepOne PCR System* (Applied Biosystems) y sus resultados se analizaron con la aplicación *StepOne TM Software V2.3*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

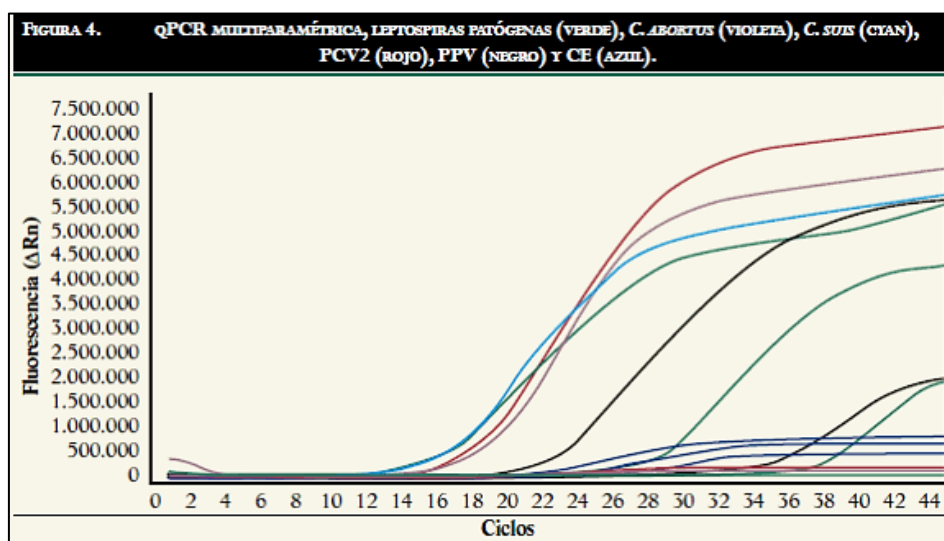
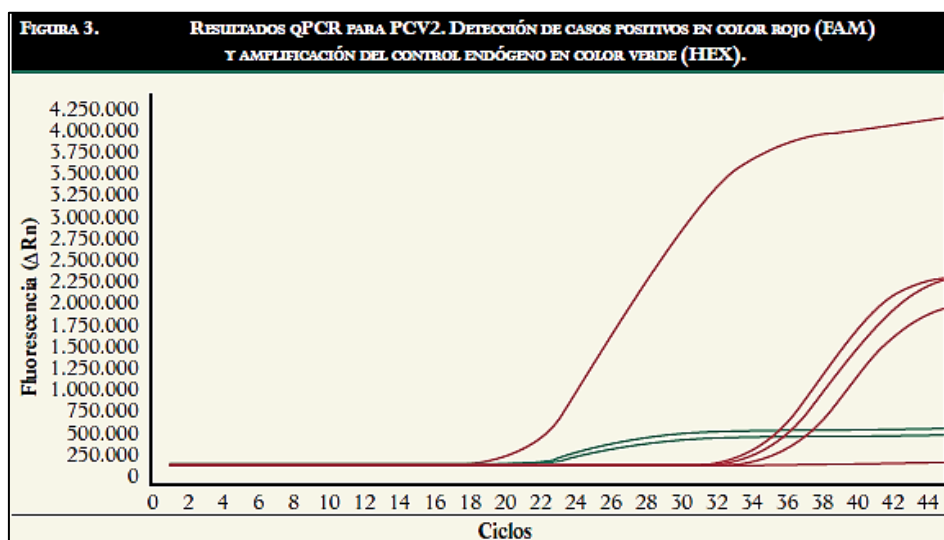
Existen múltiples agentes virales y bacterianos implicados en los fallos reproductivos porcinos. Sin duda PCV2 y PRRSv son considerados patógenos relevantes por su amplia distribución y las graves pérdidas económicas que ocasionan a nivel mundial [14]. En este trabajo, un 22 % (20/82) de los casos resultó positivo para al menos uno de los agentes evaluados. *Leptospira* patógena (8,3 %) y PCV2 (8,2 %) fueron los hallazgos más frecuentes, mientras que PPV (5,5 %) y PRRSv (3,8 %) resultaron los menos. En comparación, un estudio de fetos abortados realizado mediante PCR por Maldonado y col. (2005) describe porcentajes de animales positivos a PCV2 y PRRSv del 1 % y 9 %, respectivamente, destacando la ausencia de PPV mediante ELISA de captura de antígeno [15]. Por otro lado, un estudio reciente de Salinas y col. (2012) asocia la presencia de *C. abortus* en fetos abortados de porcinos ibéricos [16]. La implicación de este patógeno en problemas reproductivos porcinos concuerda con el 6,7 % de casos positivos encontrados en este trabajo. Adicionalmente, a pesar de que su papel es aún controvertido, nuestros resultados ponen de manifiesto la presencia de *C. suis* en un 6,6 % de los casos evaluados.

La presencia de resultados falsos negativos se descartó mediante la amplificación positiva del control endógeno en todas las determinaciones negativas (*figura 3*).

Muchos laboratorios de diagnóstico veterinario son reticentes a introducir en su rutina el uso de técnicas moleculares como la qPCR debido a la aparente complejidad en su ejecución, así como por el coste relativamente alto de los equipos y reactivos necesarios. Con el fin de solventar estas dificultades, Exopol ha desarrollado un innovador formato de qPCR que reúne las bondades propias de esta técnica como la rapidez, especificidad y alta sensibilidad, con una simplificación notable en el protocolo de ejecución del ensayo. Por otro lado, a diferencia de

la mayoría de ensayos comerciales de qPCR disponibles en el mercado, este formato no necesita transporte ni almacenamiento en congelación, lo que supone un ahorro sustancial en los costes del producto.

La rapidez en la entrega de resultados es una de las aspiraciones de todo centro de diagnóstico. La mayoría de laboratorios que ofrecen diagnóstico mediante qPCR utilizan kits comerciales con diversos protocolos térmicos, limitando la inmediatez de su respuesta en la detección de múltiples patógenos en una misma muestra. En contraposición a estos productos, los ensayos propuestos en este trabajo han sido diseñados y validados para utilizar un mismo protocolo térmico; esto ha permitido la evaluación simultánea, en un perfil multiparamétrico, de leptospira patógena, *C. abortus*, *C. suis*, PCV2 y PPV en una sola carrera del termociclador (figura 4). Por otro lado, el uso de ensayos dúplex evita la competencia de reactivos por cantidades pequeñas de ADN además de posibles interferencias entre las diferentes longitudes de onda de las moléculas fluorescentes, limitaciones descritas en algunos ensayos qPCR multiplex [17].



En conclusión, estos resultados evidencian la circulación de todos y cada uno de los agentes evaluados en la cabaña porcina de España y su entorno. Teniendo en cuenta que nuestros datos no proceden de un diseño muestral aleatorio, consideramos conveniente posteriores estudios epidemiológicos para determinar la situación real de estas enfermedades en la ganadería nacional. Asimismo, creemos que el uso de técnicas moleculares como las descritas en este artículo debe ser una realidad, ya que demuestran ser poderosas herramientas para el diagnóstico rápido y fiable de agentes patógenos.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR III, Smith TF (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev. 19:165-256.
2. Fraga D, Meulia T, Fenster S (2008). Real-Time PCR. Current Protocols Essential Laboratory Techniques. John Wiley & Sons, Inc. 10.3.1-10.3.33

3. Villa Aleida; de Tomás Elena; Benito AA; Arnal JL; Serrano JD. Evaluation of cloned genes as quantitative controls in real-time pcr assays for infectious diseases with veterinary importance. 2012. XXXV Congress iubmb & febs. Póster.
4. Aleida Villa; Benito AA; Arnal JL; Serrano JD; Elena de Tomás. Leptospirosis. Diagnóstico mediante PCR en tiempo Real y aislamiento microbiológico. 2012. XVII Congreso AVEDILA. Comunicación oral.
5. Aleida Villa, José L Arnal, J. Daniel Serrano, Alfredo A. Benito, Rafael Baselga. Development and validation of a Real-Time PCR ZEN GEL mix for the diagnosis and quantification of coxiella burnetii. 2012. EAVLD congress. Comunicación oral.
6. Villa Aleida; Fernández Ana; Arnal JL; Serrano JD; Chacón Gema; Benito AA. Desarrollo y validación de una ZEN Real Time PCR gel mix para la detección y cuantificación del gen (mp81) de Mycoplasma agalactiae. 2011. XVI Congreso AVEDILA. Comunicación oral.
7. Arnal JL. Mycoplasma ovipneumoniae Real Time PCR aplicada al estudio de las neumonías atípicas en pequeños rumiantes. 2013. Trabajo fin de Máster. Universidad de Zaragoza.
8. Benito AA; Aleida Villa; Serrano JD; Arnal JL y Elena de Tomás. Desarrollo de una PCR en tiempo real para el diagnóstico de Toxoplasma gondii. 2012. IX Congreso Nacional de Microbiología Molecular. Póster.
9. Villa Aleida; Benito AA; Arnal JL; Serrano JD y Baselga R. Diagnóstico molecular de los principales hemoparásitos del ganado bovino. 2012. XVII Congreso Internacional Anembe. Comunicación oral.
10. Villa Aleida; Benito AA; Arnal JL; Serrano JD and Baselga R. Diagnosis of main haemoparasitic diseases of cattle by REAL-TIME PCR. 2012. EAVLD congress. Póster
11. Aleida Villa; Arnal JL; Serrano JD; Benito AA; Elena de Tomás. Calidad Microbiológica de la leche. Diagnóstico mediante PCR en tiempo real. 2012. IX Congreso Nacional de Microbiología Molecular. Póster.
12. AA Benito, JL Arnal, E de Tomas, JD Serrano & A Villa. Endogenous control for reliable results in Real-Time PCR assays. 2013. WAVLD congress. Póster.
13. Martin F. Polz and Colleen M. Cavanaugh. Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. 1998. Applied and Environmental Microbiology p. 3724-3730.
14. S. Lopez-Soria, J. Maldonado, P. Riera, M. Nofrarias, A. Espinal, O. Valero, P. Blanchard, A. Jestin, J. Casal, M. Domingo, C. Artigas and J. Segales. Selected Swine Viral Pathogens in Indoor Pigs in Spain. Seroprevalence and Farm-Level Characteristics. 2010. Transboundary and Emerging Diseases. 57 (2010) 171–179.
15. Maldonado, J. Segales, D. Martinez-Puig, M. Calsamiglia, P. Riera, M. Domingo, C. Artigas. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. 2005. Veterinary Journal 169:454–456.
16. J. Salinas, N. Ortega, C. Borge, M.J. Rangel, A. Carbonero, A. Perea, M.R. Caro. Abortion associated with Chlamydia abortus in extensively reared Iberian sows. 2012. Veterinary Journal 194:133-134.

Volver a: [Enf. infecciosas de los porcinos](#)