

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL UTILIZANDO UNA SONDA UNIVERSAL (UNIVERSAL PROBE LIBRARY, UPL)

La Universal Probe Library (UPL, Roche Applied Science) es una colección de 165 sondas fluorogénicas de hidrólisis pre-sintetizadas y pre-validadas para su empleo en ensayos de PCR en tiempo real. Están formadas por una secuencia de entre 8-9 nucleótidos modificados *tspo* locked nucleic acid (LNA), y están marcadas con el fluoróforo emisor FAM en su extremo 5' y una molécula quencher especial en el extremo 3'. Originalmente se diseñaron para análisis de expresión génica y se ofrecen como un sistema de detección universal. En este caso, la especificidad de la PCR se mantiene gracias a la estricta selección de una pareja de primers específicos de la región diana a amplificar que son combinados con la sonda UPL. En el caso de no disponer de la sonda UPL, se puede utilizar una sonda Taqman estándar. El método descrito de UPL-PCR para VPPA emplea una pareja de primers específica diseñada en una región altamente conservada del genoma viral, VP72, junto con una sonda UPL (UPL#162, Roche Applied Science) o TaqMan (VP72P1). Esta combinación asegura la detección de un amplio rango de aislados de VPPA pertenecientes a los distintos genotipos descritos para VPPA (19 de 22 genotipos probados hasta ahora). Los primers amplifican un fragmento de ADN de 68 pb, entre las posiciones de nucleótidos 893 y 960 de la secuencia del gen completo VP72 de la cepa española de referencia España70 (nº de acceso a GenBank S89966). Las sondas utilizadas para la detección del producto amplificado son la sonda UPL#762, situada entre las posiciones de ambos primers y disponible comercialmente en Roche Applied Science o la sonda estándar de condiciones y concentración idénticas (Taqman VP72P1). La sonda está marcada en su extremo 5' con una molécula emisora de fluorescencia (6-carboxifluoresceína, FAM) y en el 3' con una molécula apantalladora de fluorescencia especial (dark quencher dye). La PCR es una técnica rápida, que puede completarse en pocas horas, y de elevada sensibilidad, pudiendo detectar la presencia de virus incluso antes de la aparición de los primeros signos clínicos en los animales infectados. La técnica UPL-PCR descrita a continuación es altamente sensible, siendo su límite de detección inferior a 20 copias de ADN.

Reactivos para el paso de amplificación de ADN:

- H₂O estéril libre de nucleasas, grado PCR.
- Light Cycler 480 Probes Master (ROCHE, Ref. 04707494001 (2x conc.), o de características similares)
- Sonda UPL # 162 (ROCHE, Ref: 04694490001) a una concentración de 10 pmol/ul:
5'-6FAM-GGCCAGGA-dark quencher-3'
- Sonda Taqman a una concentración de 10 pmol/ul:
5'-6FAM-TCCTGGCCRACCAAGTGCTT-dark quencher-3'
- Primers a una concentración de uso de 20 pmol/ul:
 - Secuencia primer PPA-162-F (I2):
5'-CCCAGGRGATAAAATGACTG- 3' (sentido)
 - Secuencia primer PPA-162-R (V2):
5'-CACTRGTTCCCTCCACCGATA-3' (antisentido)

REALIZACIÓN

Reacción de amplificación del ADN:

1. Preparación de la mezcla de PCR

- En un tubo de microcentrífuga color ámbar de 1,5 ml estéril, se preparará la mezcla de PCR (para un número mínimo de 10 muestras) según se describe a continuación. Preparar la mezcla de PCR evitando la luz directa.

Volumen final reacción = 20 µl	
<i>Master mix 2x</i>	→ 10 µl
Sonda *10 pmol/µl	→ 0,2 µl
<i>primer</i> PPA-162-F (I2) 20 pmol/µl	→ 0,4 µl
<i>primer</i> PPA-162-R (V2) 20 pmol/µl	→ 0,4 µl
H ₂ O estéril libre de nucleasas, grado PCR	→ 7 µl

*Sonda UPL #162 o Taqman VP72P1

- Añadir 18 µl de mezcla de PCR al número de tubos de PCR de 0,2 ml de calidad óptica necesarios para el número total de muestras a analizar incluyendo los controles positivos y negativos de extracción y reacción, más, al menos, una muestra adicional (para compensar posibles errores de pipeteo).

2. Adición de la muestra:

- Añadir 2 µl de ADN molde a cada tubo de PCR.

- Incluir R+ (2 µl de ADN de VPPA) y R- (2 µl de agua destilada) en cada PCR.

Después de añadir la muestra, cerrar bien los tubos y dar un golpe de centrifuga para bajar la mezcla de PCR. Colocar los tubos en un termociclador automatizado para PCR en tiempo real y correr el programa de incubación detallado a continuación.

3. Amplificación:

Programa de amplificación:

Activación de <i>Taq</i> DNA pol.	95°C ---- 5 min	
Desnaturalización ADN	95°C ---- 10 seg	} 45 ciclos
Anillamiento/elongación	60°C ---- 30 seg	

Programar la lectura de fluorescencia en el canal FAM al final de cada ciclo.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El punto en el cual la fluorescencia pasa de niveles no significativos (indistinguibles del fondo) a niveles claramente detectables se denomina ciclo umbral (Ct: cycle threshold), y éste será el valor umbral de intensidad de fluorescencia a partir del cual una muestra será considerada positiva. El ciclo umbral es inversamente proporcional a la cantidad de ADN molde presente en la mezcla de reacción al inicio de la misma, es decir, en la muestra analizada. El valor de Ct es determinado automáticamente por el software del termociclador empleado. En una muestra positiva se obtendrá una curva sigmoïdal representando el número de ciclos frente al valor de fluorescencia emitido, mientras que una muestra negativa mantendrá su perfil de fluorescencia por debajo del valor umbral y el equipo no reportará ningún valor de Ct (ver figura).

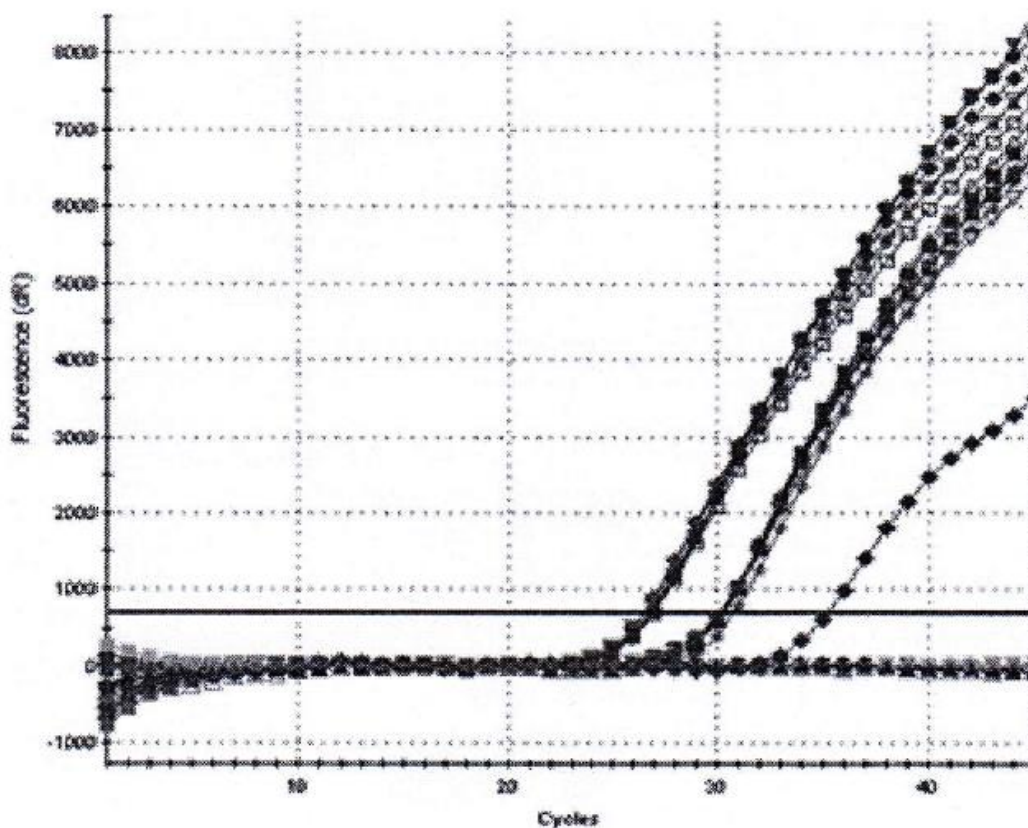
Validación del ensayo:

El procedimiento se considerará válido si los **controles positivos de extracción y reacción** muestran unos valores de Ct de 32 ± 4 , y los **controles negativos de extracción y reacción** no dan valor de Ct (≥ 40).

Interpretación de los resultados:

- Todas las muestras con valores de $Ct < 35$ deben considerarse POSITIVAS
- Todas las muestras con valores de $Ct > 40$ deben considerarse NEGATIVAS
- Todas las muestras con valores comprendidos en el rango $35 < Ct < 40$ deben considerarse DUDOSAS

Las muestras dudosas se analizarán por duplicado y se considerarán positivas siempre que se obtenga un valor de $Ct < 40$ en al menos una de las repeticiones.



REFERENCIA

Fernández-Pinero, J. *et al.* Molecular Diagnosis of African Swine Fever by a New Real-Time PCR Using Universal Probe Library. doi:10.1111/j.1865-1682.2012.01317.x