

DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) DEL ORF 5 DEL VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO DEL CERDO (PRRS)

Carreón NR¹, Cortes FR², Trujillo OME¹, Doperto DJM¹, Becerra A³, Rogelio AM².

¹Departamento de Producción Animal: Cerdos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.

²Departamento de Genética

³Multiplicadora PROAN, San Juan de los Lagos, Jal.

Correspondencia con el autor: rcn@correo.unam.mx

Introducción.

Debido a que el virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRS) es capaz de desarrollar altos niveles de variación genómica, el diagnóstico de la enfermedad debe acompañarse de la tipificación de la cepa. De esta forma, se pueden trazar los orígenes de las infecciones presentes en el sistema de producción, así como localizar focos de diseminación y vigilar si ingresan nuevas cepas, además de identificar con fines epidemiológicos las diferentes cepas que prevalecen en nuestro país. Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer la técnica de polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) para el virus de PRRS.

Material y Métodos.

Se empleó el producto de PCR-anidado del ORF 5 de una vacuna comercial para usarla como un control positivo para el desarrollo de la prueba. Además, se utilizaron 14 casos positivos a PRRS previamente detectados por PCR anidado, que corresponden a diferentes granjas ubicadas en los estados de Jalisco, Veracruz y Querétaro.

La metodología consistió en 4 fases. En primer lugar se realizó la extracción del RNA. La segunda fue realizar la RT-PCR para obtener el DNA complementario, para esto se empleó un oligonucleótido, dirigido para el ORF 5 que es una región del virus de PRRS altamente variable. La tercera fase a realizar fue la técnica de PCR anidada previamente estandarizada. Se evaluó la presencia del fragmento correspondiente al ORF 5 mediante electroforesis utilizando geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio y visualizado mediante luz ultravioleta.

La última fase fue realizar la digestión del fragmento del PCR obtenido, mediante la utilización de 3 endonucleasas: Mlu I, Hinc II y Sac II. Su visualización de los fragmentos obtenidos fue mediante un gel de agarosa.

Resultados

A partir de las muestras de campo que fueron amplificadas mediante el PCR anidado y con la utilización de las 3 endonucleasas, se logró realizar la digestión de estos fragmentos (Figura 1 y 2); por otro lado, al analizar los pa

Hinc II Mlu I 3 variantes del Hinc II Sac II
M 1 2 3 4 5 1 2 3 M 4 5 1 2 3 4 5

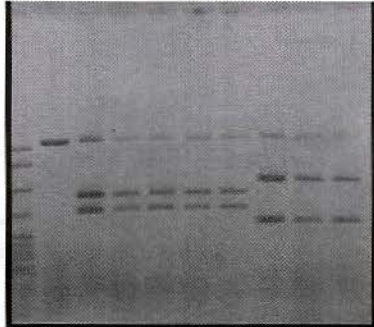


Figura 1. Fragmentos de restricción
M. Marcador de peso molecular
1-5 Muestras de campo



Figura 2. Fragmentos de restricción
M. Marcador de peso molecular
1-5 Muestras de campo

Discusión y Conclusión

Con base a los resultados anteriores, se logró establecer la técnica de RFLP a partir de los productos de PCR previamente obtenidos. Por lo que la implementación de esta, representa una herramienta de laboratorio que puede aportar información epidemiológica de la variación genómica del virus de PRRS en las granjas porcinas mexicanas al igual que como se ha utilizado en países como Estados Unidos y Canadá. Por otro lado, de la información analizada, se obtuvieron 3 patrones diferentes del virus de PRRS, lo cual nos indica la presencia de diferentes cepas, por lo que sugiere llevar a cabo la evaluación de un número mayor de muestras. En base a lo anterior, se concluye que esta técnica es una opción en la diferenciación de las cepas analizadas.

Implicaciones

El empleo de la técnica de RFLP, permitirá la tipificación de las diferentes cepas del virus de PRRS presentes en México, lo que será un factor importante para tomar decisiones en el control y erradicación de la enfermedad.