

ESTABLECIMIENTO DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DEL RUBULAVIRUS PORCINO, USANDO TRES DIFERENTES GENES.

Loza-Rubio E¹, Arreola LJ^{1,2}, Martínez-Lara A¹, Ramírez MH², Correa-Girón P¹.
¹CENID-MA, INIFAP, ²FMVZ-UNAM.

Introducción y objetivos

Desde 1992, la enfermedad del ojo azul es considerada una de las cinco enfermedades más importantes de los cerdos en México; causando pérdidas anuales de alrededor de \$20 millones de dólares norteamericanos (1). El *Rubulavirus porcino* (RvPo), pertenece a la familia *Paramyxoviridae*. Tiene un genoma de ARN con polaridad negativa, integrado por seis genes diferentes, los cuales codifican para el mismo número de proteínas: la hemaglutinina (HN) localizada en la envoltura, está relacionada con la antigenicidad y unión al receptor; las proteínas de fusión (F1 y F2), también localizadas en la membrana; la proteína de matriz (M) localizada entre la nucleocápside y la parte interna de las glicoproteínas transmembranales; la proteína de alto peso molecular (L); la fosfoproteína (P), asociada al genoma viral, y la nucleoproteína (NP) estrechamente asociada al ARN. Objetivo.- Utilizar tres diferentes genes del RvPo para implementar la técnica de PCR.

Material y métodos.

Utilizando la secuencia del RvPo, aislado en La Piedad Michoacán (LPM), se diseñaron tres diferentes pares de oligonucleótidos empleando tres diferentes genes del RvPo (LPM). Dos de éstos genes codifican para la hemaglutinina (HN) y para la proteína de fusión (F), respectivamente. El tercero codifica para la proteína de matriz (M). Los iniciadores presentan las siguientes características, entre 19-21 pb y 50% de GC. Para la extracción del ARN se emplearon dos diferentes kits comerciales (RNeasy y trizol). Para la síntesis del ADN complementario se evaluaron dos diferentes transcriptasas reversas (superscript HII y la transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina [MLV-RT]), así como el uso de oligo (dT) y del iniciador sentido para obtener la doble cadena. Se compararon los resultados obtenidos con cada gen usando diferentes cantidades de cloruro de Magnesio, picomoles de los iniciadores, y las temperaturas de alineación, además se establecieron los programas de amplificación para cada uno de los genes.

Resultados y Discusión

Los resultados indicaron que aunque con ambos reactivos comerciales se extrajo el ARN, la cantidad obtenida con el Trizol® fue mayor. En la síntesis del ADNc, los mejores resultados se lograron al usar la transcriptasa reversa del virus de la MLV-RT y el iniciador específico. De acuerdo con la curva de magnesio el usar 2.5 mM es lo más recomendable. En cuanto a los

iniciadores diseñados, fue indistinto usar 25, 50 o 100 picomoles de cada oligo por reacción. Al amplificar el segmento del gen que codifica para la HN, en los primeros ensayos se obtuvo una banda inespecífica por arriba de lo esperado. En cuanto a la proteína F, se obtuvo un segmento de 510 pb y de 382 pb para la M. La especificidad de la prueba se evaluó con el virus de PRRS, Aujeszky, Moquillo y Sarampión, la amplificación sólo se obtuvo en el carril del RVP. Al evaluar la sensibilidad de la prueba se detectaron hasta 4.6 pg/ul. De acuerdo a este estudio se concluye que los mejores resultados se obtuvieron al usar los iniciadores que amplifican los segmentos que codifican para las proteínas F y M del RVP. Esto podrá ser utilizado para detectar variaciones genéticas e implementar técnicas de diagnóstico molecular.

Referencias

- (1) Flores H., A.O. Symposium sobre enfermedades del cerdo con implicaciones en el comercio internacional. México, D.F. 1992:86-89.

* Trabajo financiado parcialmente por CONACyT (Proyecto No. 34771-B).