

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN DEL vPRRS COMO UNA HERRAMIENTA VALIOSA EN EL DIAGNÓSTICO VETERINARIO

Flores A., Ramírez G., Massa A. (*) *Lapisa SA de CV.*
mapa68@lapisa.com

INTRODUCCIÓN:

Actualmente las vacunas autógenas constituyen una opción más en el control de algunos agentes virales como PRRS, en las piaras infectadas este control requiere sin embargo un monitoreo constante para la detección de nuevas cepas,⁽⁵⁾ para lo cual se requiere contar con la técnica de secuenciación que permita conocer las cepas de importancia presentes en cada región para la elaboración de vacunas que puedan ser continuamente actualizadas.

La secuenciación del virus de PRRS es usada para investigar el origen de los brotes^(2,4), comparar aislamientos entre granjas, determinar cuántas cepas existen en una misma población, así como para determinar cuánto ha cambiado el o los virus de una población en un período de tiempo.^(4,5)

MATERIALES Y MÉTODOS:

Para determinar la secuencia genética del virus de PRRS, se utilizó un equipo de secuenciación automática DNA Analyzer 4300⁽¹⁾. Para la obtención del producto de PCR se utilizó un equipo Bio-Rad iQ5 Real Time PCR Detection System, y el producto obtenido, de 603 pb se clonó antes de secuenciar.

La clonación se llevó a cabo mediante el kit de ligación pGEM-T Easy Vector system y células competentes *E. coli* JM109.

Se utilizaron diferentes cepas de virus de PRRS aisladas en el laboratorio de diagnóstico de Lapisa y provenientes de diversas regiones de importancia porcícola en México.

Los productos de PCR obtenidos se verificaron en gel de agarosa, se extrajeron del gel mediante el kit de extracción Axyprep DNA gel extraction kit y se procedió a la clonación de los fragmentos. Para la secuenciación se utilizaron los primers "forward" y "reverse" T7 y SP6 marcados con IRdye en 700 y 800 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Los fragmentos obtenidos mediante PCR punto final fueron clonados y el producto obtenido de aprox. 1200 pb, incluye la secuencia del ORF5 del virus de PRRS contenía ya los marcadores T7 y SP6, las secuencias obtenidas a partir del mismo corresponden a 603 pb.

El análisis por medio del programa de secuenciación nos permitió obtener la secuencia de 603 pb correspondiente al ORF5 del virus de PRR⁽⁵⁾ Mediante el programa apropiado se compararon las secuencias obtenidas con otras previamente analizadas y con la del virus vivo modificado (VVM) de la vacuna actualmente autorizada en México.

Las comparaciones entre las secuencias de ORF5 de cepas de cada región del país se realizaron por medio del programa CLC Main Workbench 5 y mostraron que de 90 muestras menos del 10% presentan una similitud mayor o igual a 94% con respecto al virus vivo modificado (Vacunal).

CONCLUSIONES:

La implementación de la técnica de secuenciación del virus de PRRS en nuestro laboratorio de diagnóstico nos permitirá tener un seguimiento más rápido de cambios en las cepas de PRRS existentes en una región o regiones determinadas del país, así como detectar nuevas cepas.

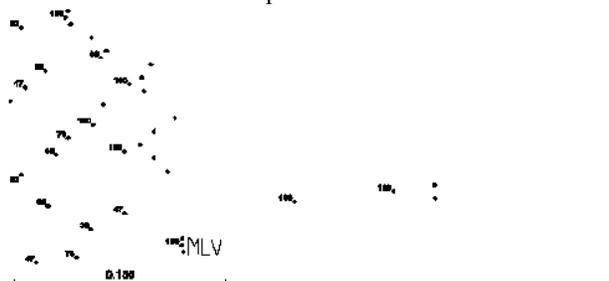


Figura 1.- Árbol filogenético obtenido por secuenciación de cepas de PRRS y comparación vs virus vivo modificado.

La clonación de los productos de PCR ofrece muestras más puras para secuenciar que las obtenidas como productos de una reacción de PCR no purificados y/o clonados. Así mismo la utilización de los primers universales marcados permiten secuenciar además del virus de PRRS, otros virus como influenza porcina y Ojo Azul entre otros, sin que la técnica sufra modificaciones.

REFERENCIAS:

- 1.- LI-COR (2010) Biosciences. Applications Manual. NEN® Model 4300 DNA Analyzer.
- 2.- Patrick L. et al, (2011) *MJ PRRS vaccine field efficacy.* American Association of Swine Veterinarians. 42nd Annual Meeting Proceeding. March 5-8,2011. Phoenix, Arizona.
- 3.- Torremorel, M., (2001) *PRRSv secuencing: application of secuencing to field cases.* Allen Leman Swine Conferencia. P-67.
- 4.- Torrison J., (2003). *Use of PRRS virus sequence information within herds ORF5 gene secuencia.* Allen Leman Swine Conferencia. P-67.
- 5.- Stas Andrew; et al. (2011). *Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Pennsylvania herds.* American Association of Swine Veterinarians. 42nd Annual Meeting Proceeding. March 5-8,2011. Phoenix, Arizona.