

DIFERENCIACIÓN DE AISLADOS DE INFLUENZA A TRAVÉS DEL DISEÑO DE PRIMERS ESPECÍFICOS.

*Mora DJC¹, Carrera AV¹, Sánchez BJI¹

¹Departamento de Medicina y Zootecnia Cerdos FMVZ, UNAM, México D.F.
juanleaf@yahoo.com.mx

INTRODUCCIÓN

La influenza porcina es una enfermedad importante debido a que estudios recientes revelan que el virus ha variado genética y antigénicamente, también es de preocupación por su significancia potencial en salud pública y se ha demostrado que causa pérdidas económicas a los porcicultores aún en ausencia de la infección en cerdos ya que conlleva a la reducción en la demanda de carne de porcino y al cierre de los mercados internacionales, por lo que el diagnóstico continúa siendo un desafío relevante, diversos subtipos virales se han aislado de los cerdos y el virus continúa evolucionando en las poblaciones humanas y animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

El objetivo del presente estudio fue diseñar un par de oligonucleótidos que diferencien entre 4 aislados virales H1N1 previamente secuenciados.

La extracción de RNA viral se realizó mediante la técnica descrita por Gibco Life Technologies 1996, para la RT-PCR punto final se utilizó el kit QIAGEN[®] One Step RT-PCR, el protocolo de ciclado con 50°C por 30 min. 95°C por 15 min. como temperaturas de pre-desnaturalización por un ciclo; desnaturalización a 94°C por 30 seg., alineación a 60°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, 40 ciclos, extensión final 72°C por 10 min. El diseño de primer se realizó con el programa Clone Mgr Versión 7.0. Realizando una alineación entre las secuencias de la hemoaglutininas de los virus Influenza A virus (A/swine/México/Mex19/2010(H1N1) (Genbank access CY122333), Influenza A virus (A/swine/México/Qro35/2010(H1N1) (CY122381), Influenza A virus (A/swine/México/Ver37/2010(H1N1) (CY122404) y A/swine/Mex/4/2009(H1N1). El diseño de primers se orientó a la detección de la cepa A/swine/Mex/4/2009(H1N1), debido a que presenta diferencias genéticas. El objetivo principal era diferenciar por RT-PCR punto final esta cepa del resto de los aislados.

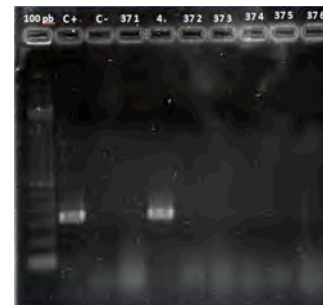
RESULTADOS

Los primers se diseñaron en regiones conservadas entre los virus, con excepción del virus de interés (A/swine/Mex/4/2009). El virus de influenza (A/swine/México/Ver37/2010(H1N1) y el virus

(A/swine/Mex/4/2009) presentaron solo 5 bases de diferencia en las posiciones 435, 440, 447, 461 y 759 del Marco de lectura abierto para el gen HN.

Los amplicones y tamaño de las secuencias obtenidos del virus de influenza A/Swine/Mex/4/2009(H1N1). fueron (335 pb), sin embargo la hemaglutinina (H1) del resto de los virus no se observó, lo cual se esperaba de acuerdo al diseño de primers.

Imagen 1.



DISCUSIÓN

Las variaciones genéticas que presentan los aislamientos de influenza porcina subtipos H1N1, pueden ser mayores al 95%, sin embargo es necesario establecer un diagnóstico preciso para cada una de ellas, que nos permita diferenciar la secuencia genómica del virus que está circulando en nuestra granja. La especificidad de los primers diseñados permitieron que, aun con solo cuatro nucleótidos de diferencia entre los virus, podamos identificar a nuestro virus de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Dieter HK. Influenza virology. In: Von Itzstein M, editor. Influenza Virus Sialidase – A drug discovery target. 2012.
- Forrest HL, Webster RG. Perspectives on influenza evolution and the role of research. In: Animal Health Research Reviews. Cambridge Journals. 2010; 11:3-18.
- Gibco Life Technologies, 1996.