

AMPLIFICACIÓN DE GENES INTERNOS DEL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA MEDIANTE LA TÉCNICA DE RT-PCR.

*CARRERA A.V,¹ MERCADO G. C,¹ MENDOZA E. S,² SÁNCHEZ B. I,¹

¹Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos. FMVZ-UNAM. ²Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. FES-C

E-mail: * vickcarrera@gmail.com

INTRODUCCIÓN.

Diversos métodos moleculares han sido desarrollados y usados para la detección y/o tipificación de los virus de influenza.¹ Debido al continuo cambio en estos virus y a las contrariedades al realizar el diagnóstico, los genes PB2, PA, NP y M que se han reordenado en los virus de doble y triple origen de manera continua, por esto el objetivo de este estudio es realizar la identificación de segmentos génicos por RT-PCR para posteriores análisis que concreten su origen.

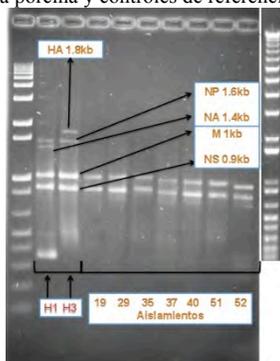
MATERIAL Y MÉTODOS.

Se utilizaron 7 aislamientos virales a partir de 33 muestras de rastro colectadas durante el periodo de 2009 a 2011 en estudios precedentes. Se replicaron y titularon los aislados y posteriormente se realizó la extracción de RNA bajo el protocolo de GIBCO-BRL, Life Technologies, 1996. Se trabajaron con 2 métodos de One Step RT-PCR. El primero descrito por Zhou *et. al.*, 2009² (RT-PCR multisegmento) que permite la amplificación del genoma completo del virus de influenza en una simple reacción con un set de primers. Se implementó una RT-PCR punto final con un set primers diseñados individualmente para la identificación de los genes PB2 (384pb), PA (596pb), NP (475pb) y M (330). El diseño de primers fue realizado en el paquete Bioinformático Clone Manager V.7.0[®] y se corroboró su especificidad mediante un análisis BLASTn en el base de datos del NCBI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la RT-PCR Multisegmento se logró amplificar para los controles de referencia A/swine/New Jersey/11/76 (H1N1) y A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2) 5 segmentos mientras que, para los aislamientos virales solo se pudieron amplificar los segmentos 7 (M) y 8 (NS).

Imagen 1. Detección de amplicones en aislamientos virales de Influenza porcina y controles de referencia por M-RT-PCR

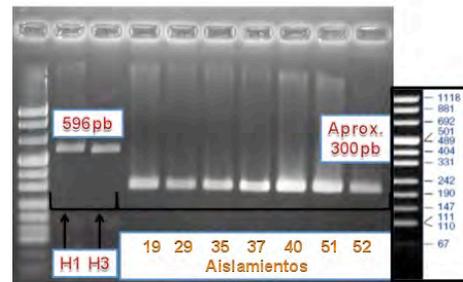


Chi-Ho Chan. *et. al.* 2006,³ indica que en las regiones conservadas de ambos el extremo 3' y 5' no se pueden utilizar como cebadores universales para la amplificación del genoma completo del virus de la influenza.

Es probable que estos resultados con el PCR multisegmentos puedan mejorar si consideramos aumentar el tamaño de los primers (entre 25 a 27) ya que esto aumenta la estabilidad de alineación (Adeyefa, C. A. *et. al.* 1994)⁴

Con la RT-PCR convencional se amplificaron de manera eficiente los segmentos individuales para los genes PB2, NP y M, sin embargo, el tamaño de amplicon para el gen PA para los aislamientos fue diferente (aprox 300pb) al diseñado de 596pb lo cual puede estar generado por cambios genéticos virales; sin embargo se alinearon perfectamente a los controles de referencia. El gen PA forma parte del complejo de replicación viral y naturalmente se liga fuertemente a la subunidad PB1, debido a múltiples mutaciones compensatorias que podrían originar el desprendimiento de ambas, generando variaciones genéticas en su secuencia.⁵ Es importante tomar en cuenta la evolución de estos genes que forman parte de una función importante en la virulencia

Imagen 2. Amplificación del gen PA en aislamientos virales y controles de referencia.



CONCLUSIÓN

El mejor método sugerido si se requiere de amplificar el genoma, es generar 8 sets de primers de manera individual. Hoffmann, (E. *et. al.* 2001)¹. Es necesario realizar análisis de secuenciación y bioinformáticos para inferir la evolución de los genes internos. Amplificando los genes a partir de muestras originales con análisis posteriores proporcionarían el escenario real del patógeno viral al que nos enfrentamos. Como primera, se debe tomar en cuenta la calidad, tipo y concentración de muestra.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Hoffman *et. al.*. Arch. Virol. 2001. 146:2275–2289.
- (2) Bin Zhou. *et. al.* Journal of virology 2009, Vol. 83, No. 19. p. 10309–10313.
- (3) Chi-Ho Chan. Journal of Virological Methods 136 (2006) 38–43.
- (4) Adeyefa, *et. al.*. 1994 Virus Res. 32:391–399.
- (5) Stéphane B *et. al.*. The Journal Of Biological Chemistry. 2010. Vol. 285, No. 37, pp.28411–28417.