

PROTOCOLO PARA LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIVIRAL POR PIROSECUENCIACIÓN

28 de abril de 2009

El Centro Colaborador de la OMS para Influenza en los CDC de Atlanta, Estados Unidos ha puesto a disposición el siguiente protocolo para la prueba de susceptibilidad antiviral por pirosecuenciación del virus de influenza porcina A(H1N1).



Equipo de Epidemiología Molecular
 Área de Vigilancia y Diagnóstico Viral
 Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
 División de Influenza

Título SOP: Pirosecuenciación Porcino-H1N1 M2 y NA

Fecha efectiva: 27 de abril 2009

NA: Sitio H274 (Numeración H275 N1)

Primers RT-PCR (20 μ M)

Uni-sw-N1-B-F780, GGG GAA GAT TGT YAA ATC AGT YGA

Uni-sw-N1-B-R1273-biot, CWA CCCA GAA RCA AGG YCT TAT G

Primer secuencial (100 μ M)

Uni-sw-N1-B-F804seq, GYT GAA TGC MCC TAA TT

M2: susceptibilidad de la adamantina

Primers RT-PCR (20 μ M)

sw-M2-F670, AGC TCC AGT GCT GGT CTG AAA G

sw-M2-R900-biot, GAC TCA GGC ACT CCT TCC GTA GAA

Primer secuencial (100 μ M)

Sw-M2-F747-seq, GCG ATT CAA GTG ATC C

Protocolo RT-PCR: Utilizando **Invitrogen Superscript III One Step RT-PCR with HiFi Taq system:**

	Volumen (ul)	Parámetros Ciclo PCR:		
2X Reaction Mix	25	Temp	Tiempo	
Superscript III HiFi Taq	1	50	30 min.	
Forward primer (20 μM)	1	94	2 min.	
Reverse primer (20 μM)	1	94	15 seg.	45 ciclos
Rnase Inhibitor	0.5	55	30 seg.	
Nuclease free water	16.5	68	60 seg.	
Total/samples	45	68	5 min.	
Template	5	4	hold	
Volumen final	50			