

FILOGENÉTICA MOLECULAR DE LOS VIRUS REFERENCIA DE INFLUENZA PORCINA SUBTIPOS H1N1 Y H3N2.

*Beltran FR¹, Trujillo OME¹, Trigo TF¹, Gasca PJ², Lopez S³, Sánchez BJI¹

¹Departamento de Medicina y Zootecnia Cerdos FMVZ, UNAM, México D.F. ² Instituto de Ecología, UNAM, México D.F. ³Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, México.
rolandobf@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La influenza porcina (IP) 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⁽¹⁾.

MATERIAL Y MÉTODOS

El objetivo del presente estudio fue describir la filogenia de los virus de referencia A/swine/New Jersey/11/76(H1N1), A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2) con base a la obtención de electroferogramas de la hemaglutinina (segmento 4) y neuraminidasa (segmento 6). 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 QUIAGEN[®] 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 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, 40 ciclos, extensión final 72°C por 7 min, para remover el exceso de reactivos que pudieran interferir con el proceso de secuenciación se purificaron los amplicones mediante QUIAquick[®] PCR Purification Kit, posteriormente fueron secuenciados utilizando el método de secuenciación Big Bye Terminator v 3.1., la PCR de secuencia se purificó mediante columnas Centri-Sep[®] para secuenciar los fragmentos de interés se empleo el analizador genético automático 3130 (Sequencing Analyzer Applied Biosystems), las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas (Clustal W) para encontrar identidades o similitudes con secuencias nucleotídicas en la base de datos del National Center for Biotechnology (NCBI)

La construcción del árbol filogenético se realizó mediante el método estadístico Neighbor-Joining, modelo Kimura 2, test filogenético Bootstrap con 1000 repeticiones.

RESULTADOS

Los amplicones obtenidos y tamaño de las secuencias del virus de influenza fueron N1 (701 pb), H3(666), N2 (382), sin embargo la hemaglutinina (H1) no se obtuvo, las secuencias obtenidas de la base de datos del GenBank (BLAST) para identificar genomas similares a las secuencias obtenidas se muestran en la figura 1.

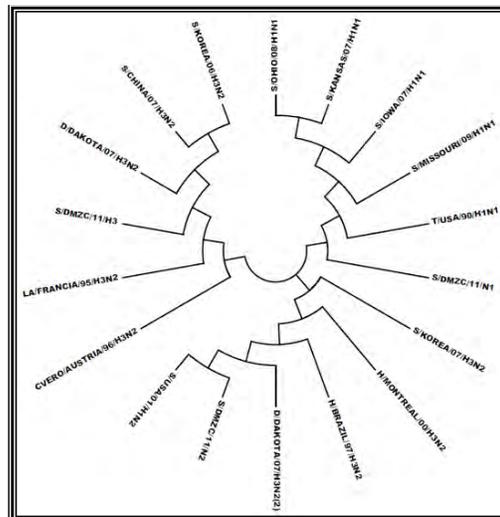


Figura 1. Caracterización genética del virus referencia de influenza porcina segmentos 4 y 6 DMZC/2011.

La neuraminidasa N1 presenta una similitud con linajes americanos de cerdos y pavo, la hemaglutinina H3 señala huéspedes de cerdos y patos, de linaje europeos, asiáticos y americanos, la neuraminidasa N2 tiene una similitud variada respecto a los huéspedes así como en la distribución geográfica.

DISCUSIÓN

El virus de influenza sufre constantes variaciones genéticas en sus genes H y N y probablemente antigénicas a nivel proteico, que les permite escapar a la respuesta inmune del huésped, estos reordenamientos constituyen una forma en que el virus evoluciona y dependiendo del sitio y tipo de mutación puede originar cambios significativos en su genoma viral, si este cambio ocurre dentro de la secuencia en donde los oligonucleótidos se alinean la amplificación será negativa; tal es el caso de no encontrar amplificación hacia el gen H1 del virus referencia, por esta razón es importante incluir dentro del diagnóstico molecular segmentos conservados.

CONCLUSIONES

El método de secuenciación genómica permitió la caracterización filogenética de los segmentos 4 y 6, así como también evaluar el nivel de divergencia entre los virus referencia y los diferentes subtipos y huéspedes reportados en el NCBI identificando el porcentaje de similitud entre diferentes secuencias.

BIBLIOGRAFÍA

1.- Narro RJ, Martuscelli J. Experiencia de la epidemia de influenza A(H1N1), México UNAM, Coordinación de Difusión Cultural, Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, 2010, 445 p.