GENOTIPIFICACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA.

*Beltran FR[1],Trujillo OME[1],Sánchez BJI[1],Gasca PJ[2],López S[3], Trigo TF[1]
[1]Departamento de Medicina y Zootecnia Cerdos FMVZ, UNAM, México D.F. [2] Instituto de Ecología, UNAM, México D.F. [3]Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, México.
rolandobf@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La pandemia del virus de influenza A/H1N1 en humanos brindo la oportunidad de visualizar la vulnerabilidad del diagnóstico para identificar el virus tanto en humanos como en porcinos, recientemente existen reportes por los CDC[(1)] que un nuevo subtipo H3N2 circula en cerdos de Norteamérica transmitiéndose a humanos, por lo tanto es importante desarrollar nuevas técnicas moleculares para realizar un diagnóstico rápido sensible y especifico que además mediante la aplicación de la bioinformática se desarrolle información necesaria para la identificación, monitoreo, vacunación, tratamiento, control y erradicación de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

El objetivo del presente estudio fue optimizar 2 diferentes métodos de OneStep RT-PCR y mediante el análisis filogenético, detectar patrones de evolución y rearreglos de las muestras secuenciadas.

Se obtuvieron 33muestras de rastro colectadas durante el periodo 2009-2011 por nuestro grupo de trabajo.

Para la identificación del subtipo viral se desarrollo la técnica de OneStep RT-PCR Múltiple descrita por Choi *et al.,* 2002[(2)] y de manera alterna implementar un RT-PCR multisegmento descrita por Zhou *et al.,*2009[(3)], para identificar los 8 segmentos genómicos del virus de influenza. Los amplicones obtenidos del subtipo H3N2 fueron secuenciados parcialmente mediante la técnica descrita por Sanger *et al.*1977.

El análisis bioinformático inicio con un análisis BLASTn y BLASTp en la base de datos del National Center for Biotechnology para corroborar la calidad de las secuencias editadas y alineadas. Para caracterizar la historia filogenética se aplicó el método estadístico de Máxima Verosimilitud mediante un análisis ModelTest para determinar el modelo de sustitución, análisis filogenético bootstrap 1000 repeticiones.

RESULTADOS

La técnica OneStep RT-PCR Multisegmento identificó 9 muestras positivas al virus de influenza tipo A (Imagen 1). La técnica de OneStep RT-PCR Múltiple identifico 14 muestras positivas al segmento N1, 1 para H3 y 3 para N2.

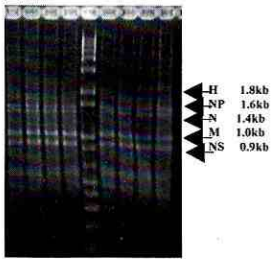

Imagen 1. Gel de agarosa al 1.5% teñido con Br-e OneStep RT-PCR Multisegmento del virus de influenza carril 1-4 subtipo H1N1, carril 6-9 subtipo H3N2.

El tamaño de la secuencia obtenida fue para H3 666 nucleótidos y para N2 382 nucleótidos, mientras que el tamaño de estas secuencias transformadas a aminoácidos fue de 218 para H3 y 119 para N2 respectivamente.

La hemaglutinina H3 presenta residuos de glutamina en la posición 226, de manera que en la construcción filogenética se incluyen las secuencias del subtipo H3N2 que circulan en cerdos y humanos de Norteamérica (Imagen2).

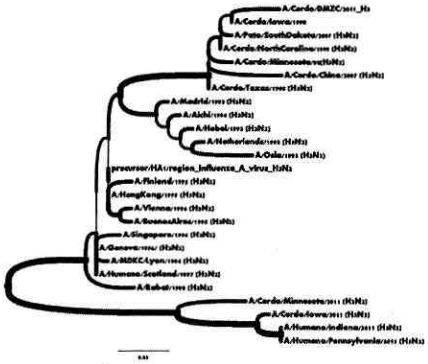

Imagen2. Árbol filogenético H3 en aminoácidos.

DISCUSIÓN

La hemaglutinina juega un papel importante durante la entrada del virus a la célula huésped. Por una parte media la unión del virus a la superficie celular a través de su interacción con ácido siálico (AS). Los residuos de aminoácidos de esta proteína que son responsables del reconocimiento de los diferentes enlaces de AS han sido ampliamente caracterizados; así, se sabe que residuos de glutamina en la posición 226 y de glicina en la posición 228 de las hemaglutininas de los subtipos H2 y H3 permiten la unión de estas proteínas a receptores de tipo aviar(α-2,3), por ello es importante considerar desde el diseño inicial de primers la región específica para el estudio, de esta manera obtener información adecuada para establecer una correcta aplicación del análisis bioinformático.

CONCLUSIONES

El segmento H3 secuenciado presenta afinidad a receptores de AS aviar, sin embargo en la reconstrucción filogenética indica una elevada similitud a virus de influenza porcinos norteamericanos que circularon en años pasados.

BIBLIOGRAFÍA

1.-Swine-Origin Influenza A (H3N2) Virus Infection in Two Children. Weekly Report.Centers for Disease Control and Prevention (CDC).60(35):1213-1215. 2011

2. Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW, Joo HS. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. Journal Virol Methods 2002; 102; 53-59.

3.- Zhou B,Matthew E. Donnelly, Derek T. Kawaoka Y,Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing andVaccine Production for Classical and Swine Origin Human. Journal of Virol. 83:19 10309-10313. 2009