

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS DEL ORF 7 DE PRRS DE MÉXICO Y AMÉRICA.

Sotomayor A^{1*}, Anaya VH², Trujillo ME¹, Sciutto E², Alonso R³, Sánchez JI¹

¹ Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, FMVZ, UNAM; ² Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, ³ Departamento de Genética y Bioestadística, FMVZ, UNAM.

INTRODUCCIÓN

Desde la descripción en 1987 de virus de PRRS se ha demostrado la gran variabilidad que éste presenta debido a su alta tasa de mutación. Este virus se clasifica en dos diferentes genotipos, Europeo (tipo 1) y Americano (tipo 2); la diversidad genética entre ellos es casi del 60%, pero es alta incluso entre cepas del mismo genotipo. El genoma del virus mide aproximadamente 15 kb y contiene nueve marcos de lectura abiertos (ORFs). Los dos ORFs más estudiados son el 5 y el 7; el primero codifica para la glicoproteína 5, y tiene mayor variabilidad mientras que el ORF 7, que codifica para la nucleocápside viral, resulta útil para la identificación de cepas y mejora el diagnóstico al ser un gen más conservado.

En este estudio se determina la posición filogenética con respecto a las secuencias reportadas en el GenBank de las secuencias obtenidas del ORF 7 del virus de PRRS durante 2012 en diferentes estados de la país.

MATERIALES Y MÉTODOS

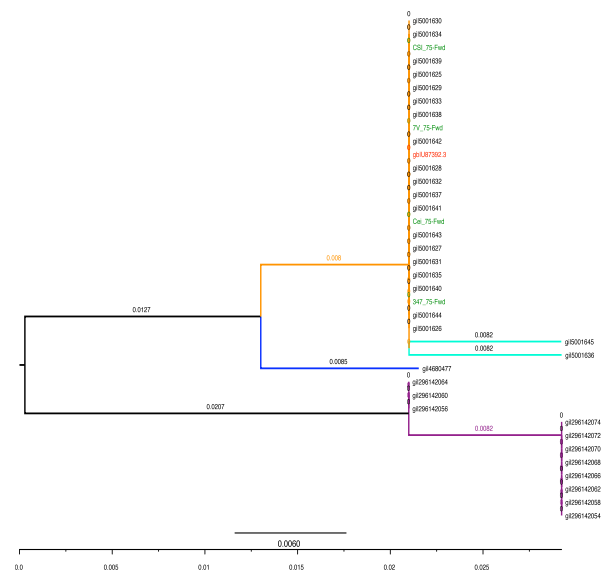
Se realizó un muestreo (hisopo nasal y pulmón) en campo en diferentes zonas con prevalencia de PRRS en la República Mexicana. El diagnóstico de las muestras se realizó por medio de RT-PCR utilizando la extracción descrita por Gibco Life Technologies (1996), oligonucleótidos específicos y el kit OneStep RT-PCR de QIAGEN®. Los productos de PCR se purificaron por electroforesis en gel (agarosa 2%) con el kit de purificación QIAmp® Viral RNA según las recomendaciones del fabricante. Los amplicones se secuenciaron en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Las secuencias de amino ácidos para ORF 7 reportadas en GeneBank se obtuvieron automáticamente y verificadas para evitar duplicidades con un script *ad hoc*. Las secuencias se alinearon con ClustalX, los alineamientos fueron editados usando Sea View v.4. Las secuencias incompletas y las regiones de los alineamientos que se extendían más allá del ORF se eliminaron. El mejor modelo de sustitución para la inferencia de los árboles filogenéticos se determinó utilizando ProtTest 3.2. Las filogenias se reconstruyeron utilizando PhyML; los parámetros se ajustaron de acuerdo al modelo de sustitución FLU.. Las filogenias fueron visualizadas y analizadas utilizando FigTree v. 1.3.1, se utilizó *midpoint rooting* para hacer la visualización más simple.

RESULTADOS

Las secuencias americanas del ORF 7 de PRRS agrupan también a las asiáticas, aunque forman una rama separada de ellas. Las secuencias americanas se

dividen en dos ramas. En una de ellas se observa gi4680477 una secuencia con tres cambios a nivel de aminoácidos. La otra rama de ese clado incluye todas las secuencias obtenidas en campo CSI_75-Fwd, 7V_75-Fwd, CEI_75Fwd así como la secuencia de referencia (gbU87392.3) y dos secuencias que se separan del grupo y que son derivadas de una cepa americana introducida a Europa durante una campaña vacunación con virus americano vivo.



CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

La alta semejanza entre las secuencias del ORF 7 provenientes de diferentes localidades sugiere que existen importantes presiones de selección manteniendo la secuencia relativamente invariable. La conservación evolutiva de el ORF 7 podría ser una característica interesante para el diagnóstico o la vacunación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. V. Kapur, M. R. Elam, T. M. Pawlovich y M. P. Murtaugh. Journal of General Virology (1996), 77, 1271-1276.
2. Yan-Jun Zhou, Hai Yua, Zhi-Jun Tian, Guo-Xin Li, Xiao-Fang Hao, Virus Research 144 (2009) 136-144.
3. Greiser-Wilke I, Fiebig K, Drexler C, Beilage Grosse E. Vet Micro 2010; 143:213-223.
4. García AR, Prieto RV, Zunzunegui KD. ISSN: RCCV Vol. 1 (2). 2007; 1988-2688.
5. Bonilauri P, Mazzoni C, Meriardi G, Barbieri I, Fallacara F, Dottori M. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark 2006; 2:12.
6. Sotomayor, G.A. (2011) Tesis Licenciatura.
7. Boussau, Bastien, Laurent Gueguen y Manolo Gouy. 2009. Evolutionary Bioinformatics Online 5 (June 25): 67
8. Darriba, Diego, Guillermo L. Taboada, Ramda, Doallo, and David Posada. 2011. Evolution. Bioinformatics 27 (8): 1164
9. Gouy, Manolo, StManolo Guindon, y Olivier Gascuel. 2010. Molecular Biology and Evolution 27 (2): 221
10. Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, et al. 2007. Bioinformatics 23 (21): 294
11. Rambaut, A. 2010. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>