

Análisis genómico y caracterización genética del primer aislado mexicano del virus de la necrosis pancreática infecciosa

Genomic analysis and genetic characterization of first infectious pancreatic necrosis virus Mexican isolate

Linda Bautista Gómez¹ , César Ortega Santana²  y José Simón Martínez Castañeda^{2†} 

¹Centro Universitario Amecameca. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Amecameca-Ayapango km. 2.5, col. Centro. 56900 Amecameca de Juárez, Estado de México, México.

²Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Atlaconulco, km 15.5, San Cayetano. 50295, Toluca, Estado de México, México.

[†]Autor para correspondencia: (jsmartinez@uaemex.mx)

Editora de Sección: Dra. Gabriela Rodríguez Licea

RESUMEN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa es uno de los agentes infecciosos más importantes de la industria trutícola y del salmón, dado que causa alta mortalidad en crías de primera alimentación. En México, es la única enfermedad viral que afecta a la trucha arcoíris, por lo tanto, información sobre la caracterización y origen genético de los aislados virales que circulan en nuestro país, ya han sido descritos, sin embargo, un análisis con el genoma completo no, motivo por el cual, el presente trabajo de investigación tiene por objetivo analizar el genoma completo del virus de la necrosis pancreática infecciosa que comúnmente circula en el país. A partir de las relaciones genéticas de un prototipo de este virus aislado en México en relación con otros aislados que circulan a nivel mundial, se encontró que el aislado mexicano del virus de la necrosis pancreática infecciosa pertenece al genogrupo I y es originado a partir de la cepa Buhl.

Palabras clave: *caracterización genética, diversidad genética, México, genoma completo, virus de la necrosis pancreática infecciosa.*

SUMMARY

Infectious pancreatic necrosis virus is one of the most important infectious agents in the salmon and trout industry since it causes high mortality in first-fed calves. In Mexico, it is the only viral disease that affects rainbow trout, therefore, information on the characterization and genetic origin of the viral isolates that circulate in our country have already been described, however, an analysis with the complete genome no, which is why this research work aims to analyze the complete genome of the infectious pancreatic necrosis virus that commonly circulates in the country. Based on the genetic relationships of a prototype of this virus isolated in Mexico in relation to other isolates that circulate worldwide, it was found that the Mexican isolate of infectious pancreatic necrosis virus belongs to genogroup I and originates from the Buhl strain.

Index words: *genetic characterization, genetic diversity, Mexico, complete genome, infectious pancreatic necrosis virus.*

Cita recomendada:

Bautista-Gómez, L., Santana-Ortega, C. y Martínez-Castañeda, J. S. (2022). Análisis genómico y caracterización genética del primer aislado mexicano del virus de la necrosis pancreática infecciosa. *Terra Latinoamericana*, 40, 1-10. e956. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.956>

Recibido: 22 de marzo de 2021. Aceptado: 11 de febrero de 2022.
Artículo. Volumen 40, agosto de 2022.

INTRODUCCIÓN

La necrosis pancreática infecciosa (NPI) es una de las enfermedades infecciosas más importantes en la industria del salmón, debido a que causa alta mortalidad en crías de primera alimentación; a nivel mundial fue identificada en el año 1960. Wolf, Dunbar y Snieszko (1981) Sin embargo en México se identificó hasta el año 2000 en granjas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) que importaban huevos oculados de Estados Unidos de América (Ortega *et al.*, 2002; Ortega, Vega y Enriquez, 2007).

El agente etiológico de esta enfermedad es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI), un miembro de la familia *Birnaviridae*, género *Aquabirnavirus*, de aproximadamente un diámetro de 60 nm, tiene un genoma de ARN de doble hebra organizado en dos segmentos. El segmento A mide aproximadamente 3097 Pb y contiene dos marcos abiertos de lectura (ORF's del inglés Open Reading Frames) Duncan, Mason, Nagy, Leong y Dobos, (1991), Barrera-Mejía, Martínez, Ortega y Ulloa, (2011). El ORF menor codifica una proteína de 17 kDa rica en argininas, no estructural (NS) denominada VP5; Magyar y Dobos (1994) y el ORF mayor codifica una poliproteína NH₂ pVP2-NS (VP4)-VP3-COOH, la cual en su proceso de maduración es fragmentada por la proteasa VP4 dando origen a las proteínas VP2, VP3 y VP4.

El genoma del segmento B mide aproximadamente 2783 Pb y codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN llamada VP1 (RdRp del inglés RNA-dependent RNA polymerase) Dobos (1995), Duncan y Dobos (1986), pero también puede dar origen a una proteína de 94 kDa llamada VPg, que está unida a través de enlaces covalentes al extremo 5' de los segmentos A and B. (Calvert, Nagy, Soler y Dobos, 1991).

La cápside del VNPI está formada externamente por la proteína VP2, mientras que el interior por la proteína VP3 de 31 kDa, y junto con la VP1 forman el núcleo de ribonucleoproteínas (Petit, Lejal, Huet y Delmas, 2000).

En el gen que codifica para la VP2 está la región del genoma del virus donde se han identificado la mayoría de polimorfismos de nucleótidos. Bain, Gregory y Raynard (2007), Hvarstein, Kalland, Christie y Endresen (1990), Santi, Vakharia y Evensen (2004) En una región hipervariable entre los residuos 243

y 335 de la proteína VP2 se encuentran los epítomos responsables para el reconocimiento antigénico, esta región de la proteína es importante porque determina la especificidad de la neutralización por unión de anticuerpos, por lo tanto, esta región es importante para inducir inmunidad y protección a los animales. (Blake *et al.*, 1995).

También ha sido propuesto que la virulencia del VNPI podría estar relacionada al segmento A en la proteína VP2, Sano, Okamoto, Fukuda, Saneyoshi y Sano (1992) por lo tanto, las cepas virulentas poseen Treonina en la posición 217 y Alanina en la posición 221, Treonina o Alanina en la posición 247 y Tirosina o Histidina en la posición 500, mientras que las cepas de mediana virulencia tienen Prolina 217 y Alanina en 221, y las de baja virulencia tienen Treonina 221 independientemente del residuo en la posición 217. Blake *et al.* (1995), Bruslind y Reno (2000), Santi *et al.* (2004), posteriormente Song, Santi, Evensen y Vakharia (2005) observaron que después de cuatro pasajes del VNPI en células CHSE-214, la VP2 presenta un cambio de aminoácido en el residuo 221 de Alanina por Treonina, pero no cuando se utilizan células RTG-2, la cual está asociada con atenuación del virus debido a su adaptación.

Debido a la existencia de diversos aislados del VNPI distribuidos a nivel mundial, diferentes clasificaciones de este aislado han sido propuestas, la primera de estas se realizó utilizando los serotipos del virus, en esta clasificación Hill y Way (1995) proponen dos serogrupos, el serogrupo A con nueve serotipos A1 (West Buxton), A2 (Spajarup), A3 (Abild), A4 (Hecht), A5 (Tellina), A6 (Canadá 1), A7 (Canadá 2), A8 (Canadá 3) and A9 (Jasper), el serotipo con mayor frecuencia en los Estados Unidos de América es el A1, en Canadá los serotipos A6, A7, A8 y A9, y en Europa el serotipo A2 y A3.

El serogrupo B tiene un solo serotipo B1 (TV-1). Con relación a la clasificación genómica de los *Aquabirnavirus* varios autores han contribuido a la clasificación de los aislados del VNPI. Bain *et al.* (2007), Blake *et al.* (1995), Cutrín *et al.* (2004), Hvarstein *et al.* (1990), Lee, Blake, Singer y Nicholson (1996) y Nishizawa, Kinoshita y Yoshimizu (2005), sin embargo esta clasificación por genogrupo no siempre coincide con los serotipos propuestos arriba. Hill y Way (1995) Blake *et al.* (1995), propusieron seis genogrupos, en el genogrupo I fueron incluidos

los aislados de Estados Unidos de América (A1) y dos aislados de Canadá (A9), En el genogrupo II se incluyen los aislados de Asia y Europa (A3), En el genogrupo III se consideran dos aislados de Canadá (C1 and ASV) (A6) y el aislado de Europa Te (A5), El genogrupo IV incluye los aislados C2 (A7) and C3 (A8) de Canadá, El genogrupo V contiene cinco aislados de Europa y uno de Asia (A2) y el genogrupo VI contiene el aislado He (A4). En adición a este genogrupo VI, Nishizawa *et al.* (2005) propone la inclusión de un genogrupo VII, que contienen los aislados encontrados en Japón y Corea.

En México el primer aislado de VNPI fue obtenido en el año 2000 Actualmente, solo secuencias parciales del genoma de este aislado han sido reportado Ortega *et al.* (2002). En este estudio fue secuenciado el genoma completo de este primer aislado identificado en nuestro país; utilizando esta secuencia genómica, se realizó una caracterización molecular de este prototipo del VNPI aislado mexicano, y se determinó sus relaciones genéticas con otros aislados a nivel mundial y, por lo tanto, su origen genético.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo Viral

Células CHSE-214 (*Chinook Salmon Embryo*) fueron utilizadas para el aislamiento y propagación del VNPI. El crecimiento de las células se realizó a 20 °C en medio MEM (Earle's Minimum Essential) suplementado con 10% de Suero fetal bovino, 400 UI mL⁻¹ penicilina y 400 mg mL⁻¹ de estreptomycin. El sobrenadante fue obtenido de las placas y posteriormente centrifugado a 3500 rpm durante 10 min a 10 °C, el sobrenadante de esta centrifugación conteniendo el virus fue depositado en crioviales con 10% de suero fetal bovino a -85 °C hasta su uso.

Extracción del ARN Viral y RT-PCR

La extracción del ARN viral fue realizada utilizando 250 mL del sobrenadante del medio de cultivo que contenía al virus, el procedimiento fue realizado utilizando la técnica de Trizol, Siguiendo las instrucciones del fabricante; una vez obtenido el ARN fue eluido en 10 mL agua DEPC (diethylpyrocarbonate 1%), e inmediatamente fue realizado el procedimiento de RT-PCR para amplificación de las regiones genómicas

correspondientes, esta técnica fue realizada utilizando el paquete Access Quick RT-PCR System, como se describe a continuación: fueron adicionados 25 mL de la reacción buffer 2X, 1 mL (10 mM) de los iniciadores forward y reverse, 17 mL de agua DEPC, 1 mL de la enzima de (5 U) y 5 mL (5 ng) de ARN.

Secuenciación del Genoma del VNPI (Prototipo Aislado Mexicano)

La amplificación del genoma completo del primer aislado mexicano reportado por Ortega *et al.* (2002) se realizó utilizando siete pares de iniciadores, seleccionados para amplificar fragmentos solapados, los nombres y las características de amplificación de estos iniciadores están indicados en la Cuadro 1.

Clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados. Los amplicones de las RT-PCR fueron purificados de los geles de agarosa con el paquete (QiaQuick Purification Kit) y fueron clonados en un vector comercial p-GEM T, posteriormente se obtuvo un purificado de 50 ng del plásmido recombinante y este fue secuenciado utilizando el Sistema Big Dye Terminator kit v.3.1 Trade Cycle Sequencing. El análisis de las secuencias fue realizado utilizando el secuenciador Genetic Analyzer 3100. Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas con el programa Mega X, Kumar, Stecher, Li, Knyaz y Tamura (2018). Para obtener la edición del genoma completo del VNPI los fragmentos secuenciados fueron concatenados y comparados a un total de 24 secuencias de genomas completos de otros aislados a nivel mundial, las secuencias de estos aislados fueron obtenidos del banco de genes del NCBI (GenBank) (Cuadro 2).

Análisis filogenéticos. Los árboles filogenéticos fueron construidos con el método Neighbour-joining. Saitou y Nei (1987), y fueron utilizadas 1000 repeticiones de bootstrap para la confiabilidad. Una red filogenética fue construida utilizando el algoritmo (median joining) con el software Network 4.6 (Bandelt, Forster y Röhl, 1999).

Virulencia de los aislados mexicanos utilizando identificación molecular. La identificación de los residuos 217 and 221 fue realizada obteniendo la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2, la clasificación fue realizada como fue reportada previamente en diferentes bibliografías. (Blake *et al.*, 1995; Bruslind y Reno, 2000; Santi *et al.*, 2004).

Cuadro 1. Iniciadores para la amplificación del genoma completo del VNPI mexicano.
Table 1. Primers for the amplification of the entire genome of the Mexican NPV.

Nombre	Secuencia	Posición	Tamaño
			bp
A-A5'Nc ^a	5'-GGAAAGAGAGTTTCAACG-3'	1-18	
A-ApaR ^{*a}	5'-CCATCGCACCAAGGAGGTAT-3'	711-731	731
A-ApaF ^{*a}	5'-GGTCAACAATCAACTAGTGACC-3'	571-593	
A-Sal ^a	5'-GCATCACACCTGATTCAG-3'	2129-2146	1576
A-NS-F ^b	5'-GCATACCCGGAACCTTCTTGA-3'	1818-1837	
A-3'NC-R ^b	5'-ACTGATCCCCTGGCCTTAAC-3'	3057-3076	1259
B-B5'NC ^a	5'-GGAAACAGTGGGTCAACG-3'	1-18	
B-HindR ^{*a}	5'-GAAGGTGAGTTGCTTCAGAAGTG-3'	477-499	500
B-HindF ^{*a}	5'-GGAAGACGGCAAGCTTAAGGACAC-3'	352-375	
B-PstR ^a	5'-GTGTTGTCTGCAGTATGTAGATG-3'	1267-1290	938
B-PstF ^{*a}	5'-AGAGACAGCCTGGACAA-3'	1217-1233	
B-BstR ^{*a}	5'-GAGTTTGGTCTCTGGTCTAG-3'	2285-2305	1072
B-SmaDF ^{*a}	5'-AGAAAACCCGGAGCCGAGATTG-3'	1898-1919	
B-Sma3'NC ^a	5'-GGGGTCCCTGGCGGAACCCGGATGT-3'	2761-2784	886
Pr A2 ^c	5'-GACAGGATCATCTTGGCATAGT-3'	1309-1330	760

*Iniciadores modificados, los nucleótidos modificados fueron remarcados con negritas. ^aIniciadores previamente reportados por Yao y Vakharia (1998);

^bIniciadores diseñados para amplificar un producto de PCR de 1259 Pb del 3' RNC de la poliproteína; ^cIniciadores previamente reportados por Blake *et al.* (2001).

*Modified initiators, modified nucleotides were highlighted in bold. ^aInitiators previously reported by Yao and Vakharia (1998); ^bInitiators designed to amplify a 1259 Pb PCR product of the 3' RNC of the polyprotein; ^cPrimers previously reported by Blake *et al.* (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Genómico del Aislado Mexicano

Los resultados derivados del análisis aportan evidencia de que el genoma completo del primer aislado mexicano del VNPI tiene la siguiente composición de nucleótidos: timina 16%, citocina 29.2%, adenina 29.6% y guanina 25.2%. El segmento A del primer aislado mexicano del VNPI mide 3076 Pb y está organizado de la siguiente manera: un fragmento de máximo 67 nucleótidos localizados en la región no codificante 5', posteriormente se encuentra el ORF menor formado por 68 a 511 nucleótidos, que codifica a la proteína VP5 de 148 aminoácidos. El ORF mayor esta sobre puesto con el ORF menor, y por lo tanto comienza en el nucleótido 120 y termina en el nucleótido 3035, el ORF mayor está organizado por tres genes: el gen que codifica la proteína preVP2, la cual comienza en el nucleótido 120 al 1592, el gen para la proteína VP4 que comienza en el nucleótido 1629 y termina en el 2294 y

el gen para la VP3 comienza en el nucleótido 2328 al 3035; y finalmente está la región no codificante 3' del nucleótido 3036 al 3076. Los tres genes de este ORF codifican una sola poliproteína de 972 aminoácidos, la cual es fragmentada después de su traducción. Los sitios de rompimiento para separar pVP2 de VP4 en el aislado mexicano fueron identificados entre los residuos 508-509 y los sitios para separar a VP3 de VP4 fueron encontrados entre los residuos 734-735. En la poliproteína fueron identificados seis potenciales sitios de N-glicosilación, cuatro en la VP2 y dos en la VP4 en los siguientes nucleótidos: 73-75, 118-120, 234-236, 254-256, 584-586 y 698-700.

El segmento B tiene un ORF de 2535 nucleótidos, comenzando en el 100 y terminando en el 2635 codifica una proteína de 845 aminoácidos. En la secuencia de aminoácidos fueron encontrados seis sitios de N-glicosilación, 7 sitio de fosforilación y un sitio tirosina fosforilación y los siguientes motivos GLPYIGKT, DLEKGE, SGNAFTFLNN, LKN y R, en los residuos 248-255, 402-407, 471-480, 521-523 y 569 respectivamente.

Cuadro 2. Secuencias utilizadas en el árbol filogenético con ambos segmentos del genoma del VNPI.
Table 2. Sequences used in the phylogenetic tree with both segments of the VNPI genome.

Nombre	Origen Geográfico	Número de acceso al GenBank	
		Segmento A	Segmento B
West Buxton	Estados Unidos	AF078668	AF078669
JasperD	Canadá	M18049	M58756
20G1d	Canadá	AY780924	AY780931
19G7e	Canadá	AY780923	AY780930
17F2	Canadá	AY780920	AY780927
19G3e	Canadá	AY780922	AY780929
5B1d	Canadá	AY780918	AY780925
19F3b	Canadá	AY780921	AY780928
6B1a	Canadá	AY780919	AY780926
México	México	JX174178	EU665685
AM-98	Japón	AY283780	AY129664
2310	España	AJ489225	AJ489241
DRT	Corea	D26526	D26527
H1	Japón	D61386	AY129665
AY-98	Japón	AY283785	AY123970
2284	España	AJ489223	AJ489239
3175	Francia	AJ622822	AJ622823
NVI 016	Noruega	AY379742	AY379743
88R	España	AJ489229	AJ489245
Sp116	Noruega	AY354520	AY354523
Sp103	Noruega	AY354519	AY354522
NVI 013	Noruega	AY379738	AY379739
Sp122	Noruega	AY354521	AY354524
NVI-015	Noruega	AY379740	AY379741

Caracterización Genética del Aislado Mexicano

El genoma completo del aislado mexicano fue comparado con genomas completos de otros 23 aislados del VNPI obtenidos de diferentes países. Utilizando estas 24 secuencias fue construido un árbol filogenético. La topología del árbol se dividió en cinco genogrupos. Solo cuatro de estos genogrupos fueron organizados de acuerdo con la clasificación de Blake *et al.* (1995) y Nishizawa *et al.* (2005). El genogrupo I tiene dos principales ramas, una contiene los aislados 19G7e, 17F2, 19G3e, 5B1d, 19F3e y West Buxton, y la otra los aislados mexicanos y los aislados AM-98, 2310, DRT y Jasper. En el genogrupo III se encuentran

los aislados 2284, 578 y 6B1a, El genogrupo V tiene a los aislados 3175, NVI 016, 88R, SP116, SP 103, AMP 013, AMP 122 y Sp 015, El genogrupo VII los aislados H-1 and AY-98. Los aislados 20G1d fueron agrupados independientemente, y no fueron caracterizados en algún genogrupo descrito actualmente (Figura 1).

En la red filogenética de los 25 aislados, se pudo observar que el aislado 20G1d se agrupó entre los aislados del genogrupo I y genogrupo III, el resto de los aislados fueron organizados de la misma forma como se organizaron en el árbol filogenético (Figura 2).

Alternativamente, dos árboles filogenéticos fueron construidos, uno con el ORF mayor del segmento A con 44 secuencias completas disponibles en el GenBank y

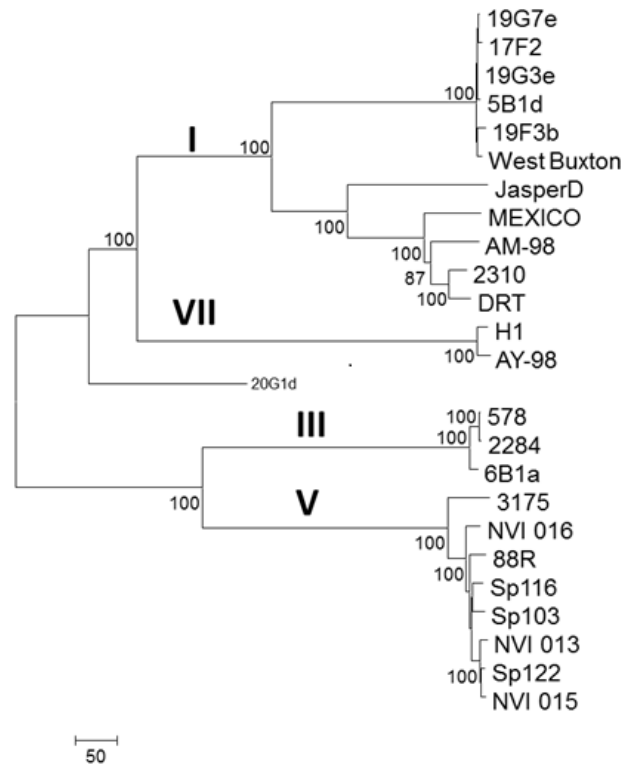


Figura 1. Árbol filogenético de genomas completos de IPNV de diferentes aislados en el mundo. Para la construcción del árbol filogenético se utilizaron 22 secuencias de aislamientos previamente reportadas más la secuencia del aislamiento mexicano prototipo, utilizando el método Neighbour-Joining. La confianza en la construcción del árbol se evaluó utilizando 1000 repeticiones de arranque. La barra de escala de distancia filogenética indica el cambio estimado por nucleótido.

Figure 1. Phylogenetic tree of IPNV complete genomes of different isolates in the world. 22 sequences of isolates previously reported plus the sequence of prototype Mexican isolate were used for constructing the phylogenetic tree, utilizing the method Neighbour-Joining. Confidence on tree construction was assessed using 1000 bootstrap replicates. The phylogenetic distance scale bar indicate estimated change per nucleotide.

otro con el ORF del segmento B con 27 secuencias completas también disponibles en el GenBank. Aunque ambos árboles mantienen la distribución de los aislados bajo la misma topología, En el árbol del segmento A del ORF mayor aparecen los aislados de los VII genogrupos previamente reportados, Pero en los árboles del segmento B solo se observan cuatro genogrupos, debido a que las secuencias para esta región se han reportado escasamente en el GenBank. Interesantemente, el aislado 20G1d en el árbol filogenético del segmento A fue localizado en el genogrupo I, pero si este mismo aislado se analiza con el segmento B se encuentra separado entre el genogrupo I y el III y forma una rama diferente dentro del árbol filogenético (Datos no presentados).

Comparando las secuencias del ORF mayor del segmento A de los diferentes aislados, los aislados genéticamente más cercanos al aislado mexicano son Buhl con una identidad de nucleótidos del 98.8% y una identidad de aminoácidos del 99.6%, y el más alejado fue He con una identidad de 74.4% nucleótidos y 80.3% en aminoácidos.

Mientras que en el análisis del ORF del segmento B, encontramos que los aislados más cercanos al aislado mexicano fueron el 2310 con una identidad del 98.2% y 98.8% en nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, y el más distante fueron el 578 y el 2284, ambos con identidades de 81% y 90% en nucleótidos y aminoácidos, respectivamente.

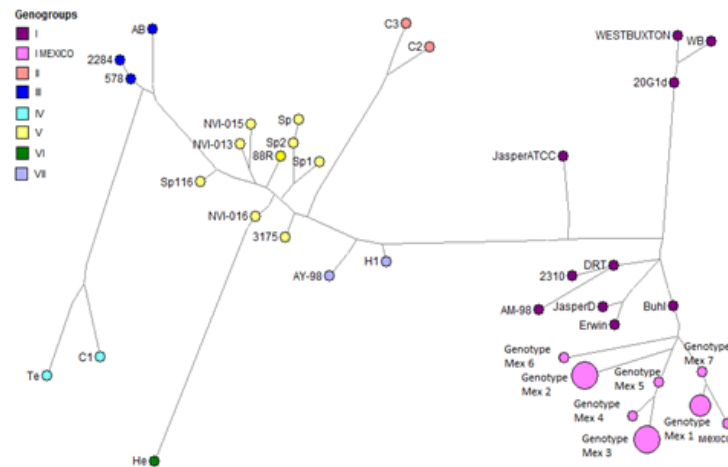


Figura 2. Red filogenética con los nucleótidos haplotipo 624-1264 del segmento A del genoma del IPNV. La red se fue construyendo con cualquiera de los aislamientos de los siete genogrupos informados previamente. Los aislamientos mexicanos se identificaron con la etiqueta de genotipos mexicanos. El tamaño del círculo es proporcional al número de muestras.

Figure 2. Phylogenetic network with nucleotides haplotype 624-1264 of segment A of IPNV genome. The network was constructing with any isolates of the seven genogroups previously reported. Mexican Isolates were identified with label genotypes Mexican. The size of circle is proportional to number of samples.

Identificación de los Aminoácidos Asociados con la Virulencia

En el análisis de los motivos de aminoácidos relacionados a la virulencia que han sido descritos en otros aislados del VNPI, nosotros encontramos que el aislado mexicano tiene el residuo 217 correspondiente a una alanina, en el 221 a una treonina, y en el 247 a un ácido glutámico.

El genoma del VNPI consiste en dos segmentos de ARN de doble hebra, denominados A y B, ambos codifican un total de cinco proteínas VP5, VP2, VP4, VP3 and VP1. La secuencia del segmento A del aislado mexicano tiene 3076 nucleótidos, otros aislados han reportado que su segmento A puede llegar a tener hasta 3098 nucleótidos; La región 3' no codificante tiene 21 nucleótidos y fue conservada en 15 aislados. Santi *et al.* (2004), Yao y Vakharia (1998). El ORF menor de este segmento tuvo la misma longitud en todos los aislados disponibles en el GenBank (584 nt), mientras que el ORF mayor vario en 468 nt, dependiendo con el aislado que se comparó.

Los resultados obtenidos demuestran que la poliproteína del aislado mexicano tuvo la mayor identidad con la cepa Buhl y difiriendo solo en cuatro

aminoácidos, específicamente tres en VP2 (72, 287, 405) y uno en VP3 (834), en el caso de las secuencias para VP5 estas aún no han sido reportadas para Buhl, por lo tanto, nuestros resultados presentan que la proteína VP5 del aislado mexicano tuvo una alta identidad con la cepa JasperD, la cual pertenece al serotipo A1. (Duncan *et al.*, 1991).

Utilizando las secuencias de los genes VP2, VP3 y VP4 en el aislado mexicano se determinó que este pertenece al serotipo A1 de acuerdo con su identidad con la secuencia de la cepa Buhl. Esto posteriormente fue confirmado en este estudio por sueroneutralización (datos no presentados).

Las secuencias del segmento B obtenidas en este estudio fueron consistentes con las obtenidas previamente por Barrera-Mejía *et al.* (2011). El segmento es de 2782 nucleótidos con un ORF que codifica una proteína de 845 aminoácidos, similar a West Buxton y JasperD, serotipos reportados por Yao y Vakharia (1998). En la comparación del ORF que codifica para VP1, nosotros encontramos que el aislado mexicano genéticamente está estrechamente relacionado con el aislado 2310 y los más alejados fueron los aislados 578 y 2284, sin embargo, un análisis con He y Buhl no pudo ser realizado, debido a que las

secuencias de este segmento no están disponibles en el GenBank para estas cepas.

Con respecto al segmento A, en la proteína VP2 están los residuos 217, 221, 247 y 500 relacionados a la virulencia del VNPI. Blake *et al.* (1995), Bruslind y Reno (2000) y Santi *et al.* (2004) en esta posición los aislados virulentos contienen treonina, alanina, treonina/alanina, tirosina/histidina respectivamente; aislados moderadamente virulentos tienen prolina y alanina en los residuos 217 y 221 y los aislados de baja virulencia o avirulentos contienen treonina en los residuos 221, estos residuos fueron analizados en el aislado mexicano para determinar su virulencia y este tuvo alanina en el residuo 217, treonina en el 221, ácido glutámico en el 247 y tirosina en el 500; Por lo tanto, el prototipo del aislado mexicano fue clasificado como avirulento.

En el árbol y la red filogenética construidos con las 24 secuencias de los genomas completos de VNPI obtenidas del GenBank, se demostró que el aislado mexicano pertenece al genogrupo I como fue previamente reportado por Ortega *et al.* (2002), Barrera-Mejía, Simón, Ulloa, Salgado y Soriano (2010), Barrera-Mejía *et al.* (2011). En la misma rama del árbol filogenético fueron agrupados los aislados AM-98, 2310 and DRT con los cuales el aislado mexicano presentó los valores más altos de identidad genética 97%, 98% and 98% respectivamente, estos aislados habían sido reportados como serotipos americanos aunque los tres fueron aislados en diferentes países (Japón, España y Corea) pero es sabido que estos países importaban huevos-oculados de truchas de los Estados Unidos de América (Cutrín *et al.*, 2004; Chung, Lee, Lee, Lee, y Kim, 1994).

Nuestros datos también confirman que utilizando árboles filogenéticos con genomas completos puede ayudar a identificar aislados del VNPI que han presentado recombinación de segmentos de genes como es el caso del aislado 20G1d que tiene el segmento A americano y el segmento B europeo, así como también el aislado 6B1a. Romero-Brey, Bandín, Cutrín, Vakharia, y Dopazo (2009). La secuenciación del genoma completo en este estudio nos permitió obtener información importante sobre el VNPI aislado en México, por ejemplo, su caracterización genómica y sus relaciones genéticas con otros aislados a nivel mundial.

CONCLUSIONES

Aunque, existe una gran cantidad de reportes de secuencias nucleotídicas, para estudiar la diversidad genética del VNPI a nivel mundial, esta información es poco informativa, debido a que la mayoría de estos trabajos se han realizado con secuencias parciales de los genomas de los aislados virales en cuestión, por otro lado, hay muy pocos reportes de este tipo de estudios donde se utilice la secuencia de genomas completos del VNPI. Este es el primer reporte de la secuencia completa del genoma del VNPI en México.

La información de la secuencia del genoma completo obtenida en este trabajo es muy importante, porque permite entender de una manera más precisa las relaciones genéticas entre los diferentes aislados distribuidos a nivel mundial.

DECLARACIÓN DE ÉTICA

Este estudio experimental, fue realizado de acuerdo a la guía de experimentación en animales de investigación de la norma oficial mexicana, NOM-062-ZOO-1999.

CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

Los autores han leído el contenido del artículo y están de acuerdo con el mismo, por lo tanto otorgan el consentimiento a la editorial de la revista TERRA Latinoamericana para que este sea publicado.

DISPONIBILIDAD DE DATOS

No aplicable.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe un potencial conflicto de interés respecto a esta investigación, para la publicación de este artículo.

FONDOS

El financiamiento de este estudio experimental fue otorgado por el Consejo de Ciencia y tecnología (CONACYT) número de proyecto 61119.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Todos los autores contribuyeron a la concepción y diseño del estudio. Preparación del artículo, la colección de datos y análisis de los mismos fue realizado por: S.M.C. el Análisis filogenético fue realizado por L.G.B.G. revisión del artículo y conceptos importantes del VNPI fueron realizados por C.O.S. Todos los autores comentaron las versiones previas del manuscrito y aprobaron el manuscrito final.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Magda Barrera Mejía por su asistencia técnica en el laboratorio de biología molecular para el procesamiento de las muestras por PCR, también agradecen a Alicia López Reyes por su asistencia técnica en el cultivo celular y la replicación del virus (VNPI), y a la Dra. Celene Salgado por la disposición de las muestras del VNPI del banco de aislamientos del CIESA.

LITERATURA CITADA

- Bain, N., Gregory, A., & Raynard, R. S. (2007). Genetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus from Scotland. *Journal of Fish Diseases*, 31(1), 37-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00864.x>
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology Evolution*, 16(1) 37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Barrera-Mejía, M., Simón-Martínez, J., Ulloa-Arvizu, R., Salgado-Miranda, C., & Soriano-Vargas, E. (2010). Molecular characterization of the VP1 gene of a Mexican isolate of infectious pancreatic necrosis virus. *Canadian Journal Veterinary Research*, 74(3), 218-222.
- Barrera-Mejía, M., Martínez, S., Ortega, C., & Ulloa-Arvizu, R. (2011). Genotyping of infectious pancreatic necrosis virus isolates from Mexico State. *Journal of Aquatic Animal Health*, 23(4), 200-206. <https://doi.org/10.1080/08997659.2011.644410>
- Blake, S. L., Schill, W. B., McAllister, P. E., Lee, M. K., Singer, J. T., & Nicholson, B. L. (1995) Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *Journal Clinical Microbiology*, 33(4), 835-839. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.4.835-839.1995>
- Blake, S., Ma, J. Y., Caporale, D. A., Jairath, S., & Nicholson, B. L. (2001). Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Disease of Aquatic Organisms*, 45(2), 89-102. <https://doi.org/10.3354/dao045089>
- Bruslind, L. D., & Reno, P. (2000). Virulence Comparison of Three Buhl-Subtype Isolates of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Brook Trout Fry. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(4), 301-15.
- Calvert, J. G., Nagy, E., Soler, M., & Dobos, P. (1991). Characterization of the VPgdsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of General Virology*. 72(10), 2563-2567. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-10-2563>
- Chung, H., Lee, S., Lee, H., Lee, D., & Kim, Y. (1994). Nucleotide Sequence analysis of the VP2-NS-VP3 gene of infectious pancreatic necrosis virus DRT strain. *Molecular and Cells*, 4(3), 349-354.
- Cutrín, J. M., Barja, J. L., Nicholson, B. L., Bandin, I., Blake, S., & Dopazo, C. P. (2004). Restriction Fragment Length Polymorphism and sequence analysis: an approach for genotyping infectious pancreatic necrosis virus reference strains and other aquabirnaviruses isolated from Northwestern Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1059-1067. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1059-1067.2004>
- Dobos, P. (1995). The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annual Review of Fish Disease*, 5, 25-54.
- Duncan, R., Mason, C. L., Nagy, E., Leong, J. A., & Dobos, P. (1991). Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology*, 181(2), 541-552. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90887-H](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90887-H)
- Duncan, R., & Dobos, P. (1986). The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucleic Acids Research* 14(4) 5934. <https://doi.org/10.1093/nar/14.14.5934>
- Hvarstein, L. S., Kalland, K. H., Christie, K. E., & Endresen, C. (1990). Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other *Birnaviridae*. *Journal of General Virology*, 71(2), 299-308. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-2-299>
- Hill, B. J., & Way, K. (1995). Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annual Review Fish Disease*, 5, 55-77. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(95\)00011-9](https://doi.org/10.1016/0959-8030(95)00011-9)
- Lee, M. K., Blake, S. L., Singer, J. T., & Nicholson, B. L. (1996). Genomic variation of aquatic birnaviruses analyzed with restriction fragment length polymorphisms. *Applied Environmental Microbiology*, 62(7), 2513-2520. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2513-2520.1996>
- Magyar, G., & Dobos, P. (1994). Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. *Virology* 204(1) 580-589. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1572>
- Nishizawa, T., Kinoshita, S., & Yoshimizu, M. (2005). An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based in the VP2/NS junction region. *Journal General Virology*, 86, 1973-1978. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80438-0>
- Ortega, C., Montes de Oca, R., Groman, D., Yason, C., Nicholson, B., & Blake, S. (2002). Case report: viral infectious pancreatic necrosis in farmed rainbow trout from Mexico. *Journal Aquatic Animal Health*, 14(4), 305-310.
- Ortega, C., Vega, F., Enriquez, R. (2007). Occurrence of the infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Hidalgo State, Mexico. *European association of fish pathologist bulletin*, 27(3), 100-107.
- Petit, S., Lejal, N., Huet, J. C., & Delmas, B. (2000). Active residues and viral substrate cleavage sites of the protease of the Birnavirus Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Journal of Virology*, 74(5), 2057-2066. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.5.2057-2066.2000>
- Romero-Brey, I., Bandín, I., Cutrín, M., Vakharia, V. N., & Dopazo, C. P. (2009). Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases*, 32(7), 585-595. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01020.x>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sano, M., Okamoto, N., Fukuda, H., Saneyoshi, M., & Sano, T. (1992). Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). *Journal of Fish Diseases*, 15(4), 283-293. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1992.tb00666.x>
- Santi, N., Vakharia, V. N., & Evensen, O. (2004). Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 322(1), 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.12.016>
- Song, H., Santi, N., Evensen, O., & Vakharia, V. (2005). Molecular Determinants of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Virulence and Cell Culture Adaptation. *Journal of Virology*, 79(16), 10289-99. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10289-10299.2005>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549 <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Wolf, K., Dunbar, C. E., & Snieszko, S. F. (1981). Infectious Pancreatic Necrosis of trout. I. A tissue culture study. *The Progressive Fish-Culturist*, 22(2), 64-68. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1960\)22\[64:IPNOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1960)22[64:IPNOT]2.0.CO;2)
- Yao, K., & Vakharia, N. (1998). Generation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus from cloned cDNA. *Journal of Virology*, 72(11), 8913-8920.