



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE ROTAVIRUS BOVINO
PREVALECIENTES EN MÉXICO COMO HERRAMIENTA
PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA
RECOMBINANTE**

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :
I.Q. WILLIAM ALFONSO RODRIGUEZ LIMAS

Tutor: Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera

CUERNAVACA, MORELOS

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera en el laboratorio del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través de los proyectos PAPIIT UNAM IN223805 e IN206407-3 y de CONACyT SAGARPA (CONACyT SAGARPA 2004-C01-103)

*“...No tenía miedo a las dificultades: lo que le asustaba era
la obligación de tener que escoger un camino.
Escoger un camino significaba abandonar otros...”*

Paulo Coelho

A mi abuela María...

Cuyo amor se siente en el aire a
pesar de que haya partido sin que
me hubiera podido despedir.

A mis padres, por su inmenso amor
a mis hermanos y sobrinos
que siempre me "han hecho barra"
(En mexicano: Me echan porras)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Palomares Aguilera por su guía constante, su visión científica envidiable y por enseñarme la pasión por el trabajo bien hecho. Por su apoyo moral en las buenas y en las malas épocas.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez por su apoyo permanente y por darme la oportunidad de conocer México y sus maravillas.

A los miembros de mi comité tutorial por su guía durante el desarrollo del presente proyecto:

Dr. Tomás López Díaz

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

A los miembros del jurado por su tiempo, dedicación y sugerencias:

Dra. Laura Palomares Aguilera

Dra. Susana López Carretón

Dra. Lucía Perezgasga Ciscomani

Dr. Leobardo Serrano Carreón

Dr. Vicente Madrid Marina

A los miembros de los grupos OTR y EG por su apoyo constante durante el desarrollo del presente trabajo.

A la gente de la unidad de docencia: Maribel, Gloria y Jalil, por su ayuda oportuna.

A Karin Levy, M. en C. Vanesa Hernández, Javier Dorantes y Dulce Pacheco por el apoyo logístico.

A mis amigos del “volley” en las épocas de triunfos y derrotas... *Thunder!!!*

A la colonia colombiana Edna, Jimmy, Magda y Sonia porque no me dejan olvidar la tierrita.

A Perla, Pepe, Sonia, Ale y la Chío por los momentos gratos en el inglés.

Al Ing. Diego Cuevas por su apoyo en las épocas de crisis y por su amistad incondicional.

Gracias a mis amigos y compañeros por las chelas, el baile y las buenas épocas:
Al negrito Jimmy, Mauricio Barrón, Toño y Clau, Julio y Sara, Germancho, Serrato y Vane, Karin, Lilí, Luis, Antonino, Ivette, Eliane, Martha y Minimí.

Índice

Índice	viii
Índice de figuras	xi
Índice de tablas	xiii
Nomenclatura	xiv
Resumen	15
Capítulo I Introducción	17
Capítulo II Antecedentes	19
II.1 Diarrea Neonatal Bovina	19
II.2 Rotavirus	21
II.3 Vacunas contra rotavirus bovino	23
II.4 Las pseudopartículas virales (PPV) como alternativa de vacunación	24
II.5 El sistema células de insecto-baculovirus (CI-BV)	25
Capítulo III Hipótesis	27
Capítulo IV Objetivos	28
IV.1 Objetivo general	28
IV.2 Objetivos específicos	28
Capítulo V Materiales y métodos	29
V.1 Estrategia experimental	29
V.2 Muestreo en Campo	29
V.3 Detección de Rotavirus grupo A	30
V.4 Extracción de RNA	31
V.4.1 Método químico	31
V.4.2 <i>Kit</i> de extracción de RNA viral	32
V.5 Identificación de genotipos P y G por PCR	33
V.5.1 Reacción de RT-PCR	33
V.5.2 Reacción de <i>multiplex</i> PCR	35

V.5.2.1	Determinación de genotipos G	35
V.5.2.2	Determinación de genotipos P	37
V.6	Líneas celulares y técnicas de cultivo	38
V.7	Confirmación de resultados por análisis de secuencias	39
V.8	Vector de expresión	39
V.8.1	Amplificación de genes para clonación en el vector pCR [®] 8	39
V.8.2	Reacción TOPO [®] <i>cloning</i>	40
V.8.3	Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	42
V.8.4	Análisis de transformantes	42
V.8.4.1	Análisis por enzimas de restricción	42
V.8.4.2	Orientación del gen	43
V.8.4.3	Análisis de secuencias	43
V.8.5	Reacción de recombinación LR	43
V.8.6	Transformación de células químico competentes de <i>E. coli</i>	44
V.8.7	Análisis de transformantes	45
V.8.7.1	Análisis por enzimas de restricción	45
V.9	Construcción de baculovirus recombinantes	45
V.9.1	Transformación de células ultracompetentes de <i>E. coli</i> DH10Bac [®]	47
V.9.2	Verificación de fenotipo	48
V.9.3	Análisis del báculo recombinante por PCR	48
V.9.4	Transfección de células de insecto	50
V.9.5	Expresión de las proteínas recombinantes	51
V.10	Transcripción <i>in vitro</i>	52
V.10.1	Purificación de partículas virales	52
V.10.2	Reacción de transcripción <i>in vitro</i>	53
V.10.3	Reacciones de RT PCR	54
Capítulo VI	Resultados y Discusión	55
VI.1	Determinación de rotavirus grupo A	55
VI.1.1	Caracterización del <i>kit</i>	55
VI.1.2	Resultado de las muestras analizadas	57

VI.2 Identificación de genotipos G	59
VI.3 Identificación de genotipos P	61
VI.4 Confirmación de resultados por análisis de secuencias	64
VI.5 Análisis de secuencias de los genotipos de rotavirus	65
VI.5.1 Segmento 9 del genoma de rotavirus	65
VI.5.2 Segmento 4 del genoma de rotavirus	68
VI.6 Construcción de baculovirus recombinantes de VP7	71
VI.6.1 Construcción en pCR [®] 8TOPO	71
VI.6.2 Clonación en el vector pDEST8 [®]	74
VI.6.3 Clonación en células de <i>E. coli</i> DH10 [®] Bac	75
VI.6.4 Transfección en células de insecto	76
VI.6.5 Expresión de GP64	77
VI.6.6 Expresión de proteínas recombinantes	78
VI.7 Construcción de baculovirus recombinantes de VP4	79
VI.7.1 Purificación de partículas virales	79
VI.7.2 Transcripción <i>in vitro</i>	80
VI.7.3 Reacción de RT PCR a partir de mRNA	81
Capítulo VII Conclusiones	82
Bibliografía	85
Anexos	88
Anexo A. Protocolo de muestreo de campo	89
Anexo B. Alineamiento de secuencias del segmento 9 del genoma de rotavirus	95
Anexo C. Alineamiento de secuencias del segmento 4 del genoma de rotavirus	98
Anexo D. Resultados del análisis de identidad (BLAST) para las muestras de campo	105
Anexo E. Vectores	110
Anexo F. Medios de cultivo	113

Índice de figuras

Figura 2.1	Terneros afectados con diarrea neonatal	19
Figura 2.2	Agentes etiológicos asociados a la diarrea neonatal bovina en Argentina	20
Figura 2.3	Esquema estructural de rotavirus	21
Figura 5.1	Zonas del territorio mexicano definidas para la obtención de muestras	30
Figura 5.2	Tarjeta para detección de rotavirus tipo A	30
Figura 5.3	Esquema general de la purificación de RNA viral por medio del <i>kit</i> QIAamp Viral RNA	32
Figura 5.4	Esquema del segmento 9 del genoma de rotavirus	36
Figura 5.5	Esquema del segmento 4 del genoma de rotavirus	38
Figura 5.6	Fundamento de la clonación con Topoisomerasa I	40
Figura 5.7	Pasos para la expresión de proteínas recombinantes en el sistema bac-to-bac®	46
Figura 5.8	Diagrama del Sistema de expresión bac-to-bac®	47
Figura 5.9	Estrategia para verificación del báculo recombinante	49
Figura 6.1	Capacidad de detección del <i>kit</i> immunocard Stat	55
Figura 6.2	Productos de RT-PCT para el segmento 9 de rotavirus	60
Figura 6.3	Productos del multiplex PCR para genotipos G	60
Figura 6.4	Productos de RT-PCT para el segmento 4 de rotavirus	61
Figura 6.5	Productos del multiplex PCR para genotipos P	62
Figura 6.6	Árbol filogenético para los 15 genotipos G de rotavirus	68
Figura 6.7	Árbol filogenético para los 26 genotipos P de rotavirus	71
Figura 6.8	Digestión de plásmido pCR®8 recombinante con XhoI.	72
Figura 6.9	Digestión de plásmido pCR®8 recombinante con EcoRI	73
Figura 6.10	Orientación del gen	74

Figura 6.11	Digestión de plásmido pDEST [®] 8 recombinante con EcoRI	75
Figura 6.12	Producto de reacción de PCR para los bácmidos recombinantes	76
Figura 6.13	Western Blot para GP64 de baculovirus	77
Figura 6.14	Western Blot para VP7 de rotavirus	78
Figura 6.15.	Gradiente de CsCl para purificación de partículas virales	80
Figura 6.16.	Western Blot de las bandas aisladas mediante gradiente de CsCl	80

Índice de Tablas

Tabla 5.1	Condiciones del proceso de RT-PCR	34
Tabla 5.2	Condiciones del proceso de <i>multiplex</i> PCR	35
Tabla 5.3	Oligos usados para amplificar el gen de VP7 y para la genotipificación G del rotavirus bovino grupo A	36
Tabla 5.4	Oligos usados para amplificar un fragmento del gen de VP4 y para la genotipificación G del rotavirus bovino grupo A	37
Tabla 5.5	Oligos para amplificación del gen completo de VP4	40
Tabla 5.6	Reacción de clonación de vectores TOPO®	41
Tabla 5.7	Reacción de PCR para verificar b́acmido recombinante	49
Tabla 5.8	Programa de PCR para verificar b́acmido recombinante	50
Tabla 6.1	Resultados del muestreo para detecci3n de rotavirus grupo A	58
Tabla 6.2	Informaci3n detallada de las muestras positivas para rotavirus A	59
Tabla 6.3	Resumen de resultados de genotipificaci3n P y G de las cepas de rotavirus aisladas de heces fecales bovinas y de la vacuna Scourguard®	62
Tabla 6.4	Resultados de la comparaci3n de identidad (BLAST) de las muestras de campo secuenciadas	65
Tabla 6.5	Cepas de rotavirus representativas de los 15 genotipos G	66
Tabla 6.6	Porcentaje de homologi3a de los 15 genotipos G de rotavirus	67
Tabla 6.7	Cepas de rotavirus representativas de los 26 genotipos P	69
Tabla 6.8	Porcentaje de homologi3a de los 26 genotipos P de rotavirus	70
Tabla E.1	Características del vector PCR®8/GW/TOPO®	110
Tabla E.2	Características del vector pDEST®8	112

Nomenclatura

A₂₆₀	Absorbancia medida a 260 nm
cDNA	Ácido desoxiribunucleico complementario
CI-BV	Sistema células de insecto - baculovirus
DEPC	Dietilpirocarbonato
DLP	Partículas virales de doble capa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Solución de nucleótidos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FBS	Suero fetal bovino
f_d	Factor de dilución
LB	Medio Luria Bertani (Anexo F)
MCS	Sitio múltiple de clonación
MDI	Multiplicidad de infección
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPV	Pseudopartículas virales
RT	Reacción de retrotranscripción
SAM	S-Adenosil-metionina
SDS	Sodio dodecil sulfato
SG	Subgrupo

RESUMEN

Rotavirus es la principal causa de diarrea en terneros, presentándose principalmente entre la primera y tercera semana de nacidos. Ya que existen muchos serotipos de rotavirus bovino en el campo, es importante prevenir estos brotes, mediante la incorporación de los serotipos predominantes en las vacunas, para conferir una inmunización pasiva óptima a los terneros. Para ello, se realizó la genotipificación de cepas de campo de rotavirus bovino, que fueron aislados de ranchos de cría en las zonas ganaderas mexicanas. Se muestrearon 26 ranchos con episodios de diarrea neonatal, también se muestrearon animales que estuvieron enfermos y que ya no presentaban síntomas y animales sanos como control negativo. En total se analizaron 128 muestras fecales provenientes de zonas ganaderas de 10 estados mexicanos. El 15.6% de los animales que presentaban síntomas de diarrea neonatal resultaron positivos para rotavirus grupo A. Estos animales se encontraban en un rango de edad entre 5 y 42 días de nacidos, lo cual corresponde a datos reportados en la literatura (Holland, 1990). La enfermedad fue hallada en 7 de los 10 estados muestreados. Un dato importante para analizar es que animales cuyas madres habían sido vacunadas contra genotipos G6,P[1] (vacuna comercial), fueron afectados por rotavirus de genotipos G10,P[11]. Este grupo corresponde al 36.4% del total de positivos encontrados, mostrando así una vez más que la protección entre genotipos es limitada y que la vacuna disponible en el mercado podría no ser la mejor para el país. Los genotipos hallados fueron los siguientes: G10, P[11] (67%); G6, P[5] (25%); G10, P[5] (8%). La información encontrada mostró una relación clara entre genotipos y especie, ya que éstas combinaciones son las más comunes en bovinos.

Se corroboró que la metodología propuesta para la genotipificación es adecuada para los genotipos predominantes en México.

Se estableció la metodología para realizar la construcción de baculovirus recombinantes de los genotipos G10, G6, P[5] y P[11]. Se usó la metodología de clonación usando el sistema Gateway[®]. La construcción obtenida por recombinación fue transformada en células DH10[®]Bac de *E. coli* para obtener un báculo recombinante que contenía los genes de las proteínas de interés. Los báculos obtenidos se utilizaron para transfectar células de insecto y obtener baculovirus recombinantes que expresaron eficientemente las proteínas de los genotipos G6 y G10.

También se describen las dificultades encontradas en el proceso de clonación de VP4 y se proponen nuevas metodologías para realizar eficientemente el proceso de amplificación del segmento 4 de rotavirus para los genotipos P[11] y P[5], los cuales no pudieron ser clonados dentro del marco de esta tesis de maestría.

En conclusión, el presente documento permitió establecer algunos de los genotipos de rotavirus circulantes en las zonas de muestreo del territorio mexicano en el periodo comprendido entre noviembre de 2005 y junio de 2006; siendo ésta la primera aproximación para el desarrollo de una vacuna recombinante basada en pseudopartículas virales (PPV) que podrá ser útil en el campo veterinario mexicano. También se explican las herramientas moleculares utilizadas en el proceso de genotipificación y de construcción de baculovirus recombinantes que serán utilizados para expresar eficientemente proteínas de rotavirus que al ensamblarse adecuadamente se usarán como principio activo de una vacuna contra rotavirus que proteja eficientemente al ganado bovino de la región.

Capítulo I

Introducción

Una de las principales problemáticas presentadas para los procesos productivos de tipo pecuario, son las pérdidas económicas asociadas a enfermedades del ganado. Dentro de la gama diversa de enfermedades aparece la diarrea, de la que las principales víctimas son las crías de bovinos, porcinos, ovinos y caprinos. Se ha encontrado que la infección por rotavirus es la principal causa de enfermedad diarreica en neonatos de bovinos y porcinos, encontrándose frecuentemente en las heces de animales enfermos (Snodgrass *et al.*, 1986, Holland, 1990).

Las vacunas tradicionales basadas en virus atenuados o inactivados, son frecuentemente ineficientes e inseguras, ya que pueden contener contaminantes patógenos para los animales a inmunizar y pueden presentar reversión de la atenuación o una deficiente inactivación, lo que desencadena el desarrollo de la enfermedad. Además, se ha encontrado que la protección entre diferentes serotipos de rotavirus es limitada (http://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/vb_notices_2004.shtml), con lo que la protección brindada por estas vacunas es restringida y específica a unos pocos serotipos que no necesariamente se han encontrado en el territorio mexicano.

El desarrollo de vacunas de última generación ha abierto el campo de investigación hacia el tratamiento de diversas enfermedades. Entre estas nuevas alternativas, se encuentran las vacunas recombinantes y entre ellas las pseudopartículas virales (PPV), donde se utilizan las proteínas estructurales del virus, sin material genético, dando como resultado estructuras altamente inmunogénicas y seguras (Fernández *et al.*, 1998). Para su producción se utilizan sistemas recombinantes, donde se expresan las proteínas que constituyen las

PPV, que bajo condiciones adecuadas se ensamblan en estructuras idénticas a los virus nativos (Crawford *et al.*, 1994). El proceso de ensamblaje así como las posteriores etapas de purificación tienen alta complejidad y determinan la economía global del proceso.

El presente proyecto tiene como finalidad la identificación de los genotipos de rotavirus bovino prevalecientes en el territorio mexicano y la utilización de esta información para la construcción de vectores recombinantes que permitan la producción de PPV de rotavirus que puedan proteger eficientemente al ganado bovino del país.

Capítulo II

Antecedentes

II.1 Diarrea Neonatal Bovina

La diarrea neonatal es una enfermedad multifactorial compleja de los terneros recién nacidos. Clínicamente suele presentarse desde las 12 horas posparto hasta los primeros 35 días de vida y se caracteriza por excreción de heces acuosas y profusas, deshidratación progresiva, acidosis y, en casos severos, muerte en pocos días. (Figura 2.1). En Latinoamérica, la diarrea neonatal de los terneros es específicamente grave y frecuente, provocando importantes pérdidas económicas por morbilidad y mortalidad. La repercusión económica es importante ya que su elevada incidencia (superior al 60%) implica tratamientos veterinarios, demanda de tiempo y mano de obra. Además, los porcentajes de mortalidad pueden llegar a ser importantes (hasta el 20%), así como el retraso en el desarrollo corporal que manifiestan los animales afectados (Odeón, 2001).



Figura 2.1. Terneros afectados con diarrea neonatal. En: www.pcca.com.ve

Los agentes etiológicos involucrados son variados, siendo los virus los más importantes. Rotavirus, coronavirus y varios enterovirus se hallan distribuidos

ampliamente en la población bovina. Se ha encontrado que la acción de los virus suele actuar como factor predisponente para infecciones bacterianas secundarias (Holland, 1990). Los virus causan destrucción y atrofia de las células intestinales, provocando disfunción intestinal y mala absorción de nutrientes, con acumulación de leche parcialmente digerida en la luz intestinal y aumento de la presión osmótica que favorece el proceso diarreico.

Entre los agentes virales, los **rotavirus bovinos del grupo A** se encuentran ampliamente distribuidos, habiéndose demostrado como el principal agente causal de diarrea neonatal en ranchos de cría (Parwani *et al.*, 1994, Reynolds *et al.*, 1986, Saif *et al.*, 1996). El diagnóstico etiológico de la diarrea neonatal bovina se basa en la detección del agente en materia fecal de terneros diarreicos y/o a partir de muestras de intestino obtenidas en necropsias. En un estudio realizado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina, INTA, se encontró que el 35.2% de las crías enfermas estaban afectadas por rotavirus del grupo A y que éste participaba en coinfecciones con *Cryptosporidium* y *Salmonella spp*, añadiendo un 9.4% a la incidencia global (Fig. 2.2).

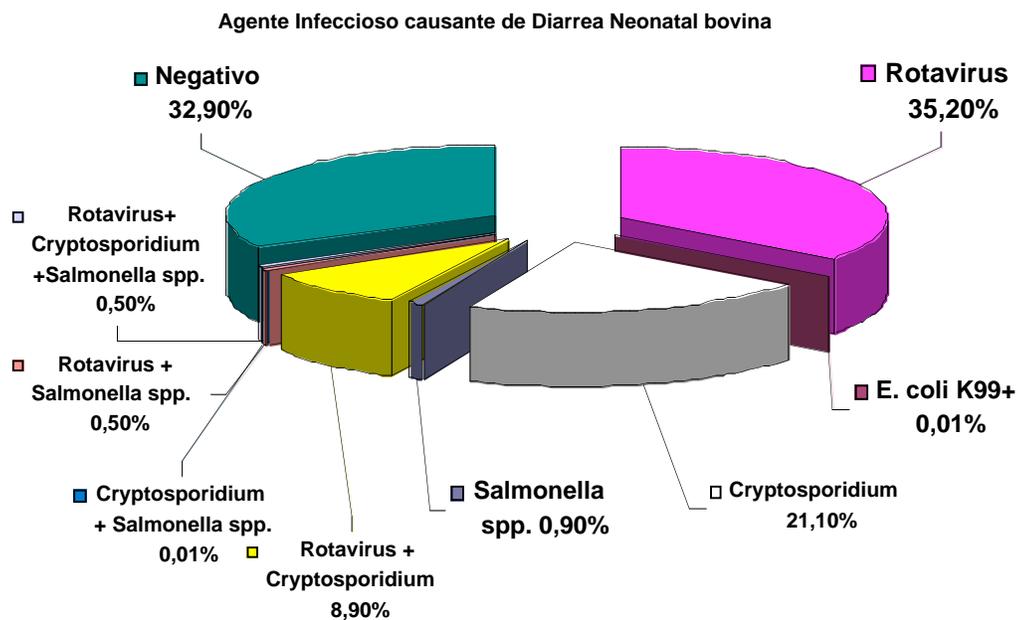


Figura 2.2. Agentes etiológicos asociados a la diarrea neonatal bovina en Argentina (2001). En: www.inta.gov.ar

II.2 Rotavirus

El rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae* y posee 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA). Estructuralmente está formado por dos capas proteicas internas VP2 (102 kDa) y VP6 (44 kDa) y dos proteínas de cápside exteriores, VP4 (88 kDa) y VP7 (38 kDa), además de VP1 y VP3 que están unidos al dsRNA (Fig. 2.3.).

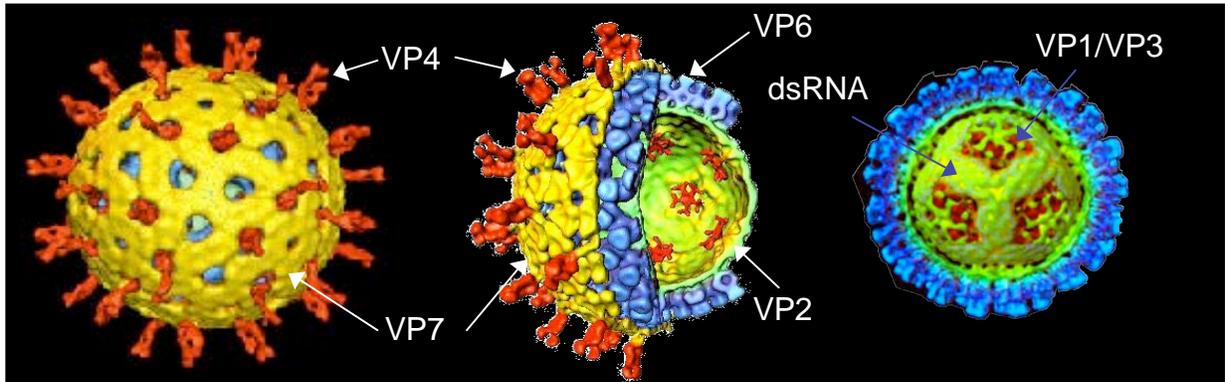


Figura 2.3 Esquema estructural del rotavirus. (Adaptado de Patton and Spencer, 2000).

Las propiedades antigénicas del rotavirus (grupo, subgrupo y serotipo) están determinadas por las proteínas de cápside VP6, VP7 y VP4. La especificidad de grupo y subgrupo está determinada por la proteína VP6, con base en la cual los rotavirus se clasifican en siete grupos (A a G), de los cuales el grupo A es el de mayor importancia epidemiológica. Los grupos A, B y C han sido aislados tanto en humanos como en animales, pero muy pocos rotavirus de grupos diferentes al A han podido propagarse en cultivo celular (Shinosaki *et al.*, 1996, Estes, 1996).

Para los rotavirus del grupo A se han definido diferentes subgrupos (SG), dicha clasificación se basa en la presencia o ausencia de distintos epítopes inmunoreactivos que se encuentran en la proteína VP6. Se conocen así el SG I, SG II, SG I+II, SG no-I y no-II, según sean reactivos o no a anticuerpos monoclonales específicos. El SG II es el más frecuente entre las cepas humanas mientras que el SG I es más frecuente entre las cepas de origen animal (López *et al.*, 1994).

Las proteínas virales de la cápside externa VP7 y VP4 definen los serotipos G y P, respectivamente. VP4 es una proteína sensible a proteasa (P), mientras que VP7 es una glicoproteína (G). Así, la clasificación de los rotavirus es un sistema binario que distingue distintos serotipos de las proteínas VP7 y VP4 que son determinados por su reactividad con antisueros monoclonales neutralizantes (Estes, 1996).

La poca disponibilidad de anticuerpos neutralizantes que reconocieran los serotipos de la proteína VP4 llevó a la necesidad del estudio de sus propiedades basándose en la secuencia nucleotídica del segmento 4 del genoma de rotavirus. Así pues, la genotipificación es una alternativa para sustituir la falta de reactivos inmunológicos. Hasta la fecha, se han caracterizado 15 genotipos G y 26 genotipos P de rotavirus, (Cardoso *et al.*, 2000, Estes, 1996, Liprandi *et al.*, 2003, Martella *et al.*, 2003, Martella *et al.*, 2006, McNeal *et al.*, 2005, Okada *et al.*, 2000, Rahman *et al.*, 2005, Rao *et al.*, 2000, Sereno *et al.*, 1994). De los 26 genotipos P conocidos hasta la fecha, solo 16 corresponden con serotipos conocidos. En contraste, para el caso de VP7 existe una relación muy clara entre genotipo y serotipo.

Dentro de cada serotipo G, la homología a nivel de secuencias de aminoácidos es alta (91-100%). En cambio, entre cepas de diferentes serotipos es bastante menor, llegando a encontrarse homologías entre el 55 y 82%. En el caso de la proteína VP4, el grado de homología existente entre secuencias nucleotídicas pertenecientes al mismo genotipo es superior al 89%. (Cao *et al.*, 1999, Estes, 1996, Gentsch *et al.*, 1996, Sereno y Gorziglia, 1994)

En el caso de rotavirus A de tipo bovino, se han identificado por lo menos 10 serotipos G (G1-G4, G6-G8, G10, G11 y G15) y 5 genotipos P (P[1], P[5], P[11], P[17] y P[21]). La mayoría de los genotipos de rotavirus parecen estar restringidos entre especies, pero también se han encontrado transmisiones inter-especies. (Khamrin *et al.*, 2006). El virus completo puede ser transferido de animales a

humanos y viceversa, pero en raras ocasiones produce manifestaciones clínicas severas en el nuevo huésped (Rahman *et al.*, 2005). De acuerdo a informes previos, los genotipos G6 y G10 y más recientemente los genotipos G8, P[1], P[5] y P[11], han sido frecuentemente encontrados en muestras fecales de terneros con diarrea a través del mundo. (Alfieri *et al.*, 2004, Barreiros *et al.*, 2004, Falcone *et al.*, 1999, Fukai *et al.*, 2002, Gulati *et al.*, 1999, Suzuky *et al.*, 1993, Wani *et al.*, 2004.). Sin embargo, no existen estudios recientes acerca de cuáles son los genotipos bovinos prevalecientes en México.

II.3 Vacunas contra rotavirus bovino

En bovinos se han administrado vacunas comerciales que contienen la cepa de rotavirus NCDV (G6, P[1]) a vacas gestantes para proveer inmunidad a los terneros recién nacidos (Barreiros *et al.*, 2004). Aunque algunos autores describen protección heterotípica, en la práctica, la diarrea provocada por rotavirus del grupo A ocasionalmente ocurre en terneros cuyas madres habían sido vacunadas. (Barreiros *et al.*, 2004). En la actualidad, en México se utiliza la vacuna Scourguard[®]3 (K/C) (Pfizer), la cual es utilizada en los ranchos para la producción de carne y leche. Esta vacuna es de tipo multipropósito y contiene cepas inactivadas de rotavirus, coronavirus y *E coli* K99, además está formulada con toxoide de *C perfringes* tipo C y gentamicina como conservador. (www.scourguard.com). Las dificultades presentadas por la aplicación de vacunas con genotipos no endémicos radica en que al no ser específicas, pueden presentar deficiente o ninguna actividad inmunogénica posterior a la aplicación debido a que la eficacia depende de la homología con los rotavirus nativos y a los diferentes grados de virulencia de cada genotipo (www.usda.gov).

A pesar de que existen vacunas para rotavirus producidas de manera tradicional, estas son frecuentemente ineficientes e inseguras. Desde el punto de vista de obtención a gran escala, la producción de virus puede constituir un riesgo. Primero, la infraestructura necesaria para producir virus potencialmente patógenos

es muy compleja y requiere de un estricto control. Además, el producto terminado no está exento de riesgos, ya que existe la posibilidad de reversión de los virus atenuados o de una deficiente inactivación, lo que puede resultar en la transmisión de la enfermedad. Otro problema es la contaminación con otros virus que pueden estar presentes en el sistema de producción. Un ejemplo es la contaminación con pestivirus, causantes de enfermedades graves en cerdos, ovejas, vacas y cabras (Organización Mundial de Sanidad Animal, www.oie.int).

II.4 Las pseudopartículas virales (PPV) como alternativa de vacunación

Las PPV han sido utilizadas para inmunizar contra varios virus. Ensayos clínicos han demostrado que PPV ensambladas de la proteína estructural L1 del papilomavirus humano (VPH) pueden reducir la incidencia de la infección del VPH y el cáncer cervical (Koutsky *et al.*, 2002; Villa *et al.*, 2005). La vacuna Gardasil[®] (Merck & Co. Inc), ya fue aprobada por la FDA para su uso en humanos (8 de junio de 2006, <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2006/NEW01385.html>). Otras enfermedades que son objetivo de las vacunas basadas en PPV incluyen gastroenteritis (rotavirus y virus Norwalk), hepatitis C y malaria (Pattenden *et al.*, 2005).

Para el caso de rotavirus, las PPV son producidas al expresar las proteínas estructurales del virus en un sistema recombinante, la mayoría de las veces usando el sistema células de insecto-baculovirus (CI-BV). Estudios previos han demostrado que la estructura tridimensional de las PPV logra una excelente respuesta inmune humoral y celular de forma segura (Jiskoot *et al.*, 1997). Para el caso de PPV de rotavirus bovino se ha demostrado que los títulos de anticuerpo que se obtienen en calostro o leche después de vacunar a vacas preñadas son incluso mayores que aquellos obtenidos al vacunar con virus inactivados (Fernández *et al.*, 1998, Kim *et al.*, 2002). Otra ventaja adicional es que pueden obtenerse estructuras polivalentes, que protejan simultáneamente contra varios genotipos, de forma versátil y sencilla (Kim *et al.*, 2002).

II.5 El sistema células de insecto-baculovirus (CI-BV)

La producción de PPV para rotavirus requiere la expresión simultánea de varias proteínas virales y el complejo proceso de ensamble para formar la estructura viral. Dentro de los sistemas más utilizados se encuentra el sistema células de insecto-baculovirus (CI-BV), que consiste en infectar un cultivo de células de insecto con uno o varios baculovirus recombinantes que expresen el gen o genes de interés, usualmente bajo el promotor *polh*. Este sistema tiene varias ventajas: es un sistema eucariótico superior altamente productivo, capaz de producir proteínas con modificaciones muy similares a las de los mamíferos, y la construcción de los vectores recombinantes es sencilla.

El promotor de poliedrina (*polh*) de baculovirus es activado y fuertemente transcrito durante la fase muy tardía de la infección, lo que evita que la expresión de los genes heterólogos interfiera sobre la producción de los baculovirus, y que exista poca presión de selección sobre el virus para mutar hacia la delección o inactivación del gen heterólogo (O'Reilly *et al.*, 1992). Esta ventaja, sumada a la posibilidad de trabajar con dos promotores fuertes en orientaciones opuestas para generar altos niveles de expresión de dos genes diferentes, han incrementado su uso en sistemas complejos. Dadas estas características, en este trabajo se construirán los baculovirus necesarios para la producción de PPV en el sistema CI-BV de los genotipos que resulten relevantes.

En el sistema de CI-BV es posible obtener diferentes estructuras de PPV de rotavirus, dependiendo de las proteínas expresadas. Estas estructuras pueden ser simples (expresión de VP2) o multicapa (VP2/VP6, VP2/VP6/VP7, VP2/VP6/VP7/VP4) (Crawford *et al.*, 1994; Labbé *et al.*, 1991), pero pueden obtenerse estructuras incompletas o con diferente morfología. Dentro de los estudios de ensamblaje, se ha encontrado que la formación de la primera esfera de proteína constituida por (VP2) es un paso importante para la formación de partículas estables. Luego, debe ensamblarse VP6, que es indispensable para la

unión de VP7 y VP4. VP4 puede unirse a la estructura VP2/VP6 sin necesidad de VP7, y viceversa (Crawford *et al.*, 1994). Estudios previos de nuestro grupo de investigación han conllevado a encontrar condiciones de expresión de VP2 y VP6 que pueden servir como punto de partida para el análisis del ensamblaje de las PPV completas (Mena, 2004, Palomares *et al.*, 2002).

El presente proyecto tiene como objetivo la identificación de los genotipos de rotavirus bovino mexicanos y la construcción de vectores recombinantes que contengan los genotipos prevalecientes. Con estos vectores se podrán obtener PPV que contengan los genotipos G y P relevantes para México.

Capítulo III

Hipótesis

El conocer los genotipos de rotavirus bovino prevalentes en México y clonar los genes correspondientes permitirá obtener vectores recombinantes que pueden ser utilizados como vacunas recombinantes, y que protegerán de forma eficiente al ganado bovino de la región.

Capítulo IV

Objetivos

IV.1 Objetivo general

Determinar cuáles son los genotipos de rotavirus bovino prevalecientes en las zonas ganaderas mexicanas y clonar los genes correspondientes de VP7 y VP4.

IV.2 Objetivos específicos

Determinar la presencia de rotavirus en muestras de heces fecales de neonatos bovinos de distintas zonas del país.

Identificar genotipos de rotavirus bovino aislados de muestras de heces fecales, provenientes de diferentes zonas del territorio mexicano con problemas de diarrea bovina asociada a rotavirus.

Construir baculovirus recombinantes que contengan los genes de VP4 y VP7 de los principales genotipos aislados.

Capítulo V

Materiales y Métodos

V.1 Estrategia experimental

Se recibieron muestras de heces fecales de neonatos bovinos de diferentes zonas del país, afectados o no por diarrea neonatal bovina. Se identificaron las muestras que poseían rotavirus tipo A y a partir de las muestras positivas se establecieron los genotipos predominantes. Con esta información se construyeron baculovirus que codifican para VP4 y VP7 de los genotipos encontrados. Estos genes fueron expresados en cultivos de células de insecto.

V.2 Muestreo en campo

Se realizó muestreo en diferentes zonas del territorio nacional, en ranchos de cría para ganado lechero y ganado doble propósito, en colaboración con la empresa farmacéutica veterinaria Biozoo S.A. de C.V. Las zonas de recolección fueron establecidas al inicio del proyecto (Fig. 5.1) y se muestrearon animales afectados por la enfermedad. También se muestrearon animales asintomáticos para determinar posible presencia de rotavirus en animales sanos y para tener un control negativo en el proceso de identificación de rotavirus bovino tipo A. Las muestras de heces fecales se recibieron en el IBt-UNAM máximo dos días después del muestreo. Estas muestras fueron recibidas en contenedores con hielo, luego se alicuotaron y congelaron a -70°C hasta su utilización. La información completa de los ranchos muestreados fue recibida en el protocolo establecido por Biozoo y que se encuentra en el anexo A.



Figura 5.1 Zonas del territorio mexicano definidas para la obtención de muestras.

V.3 Detección de Rotavirus grupo A

La detección de rotavirus tipo A en muestras fecales se realizó utilizando un *kit* comercial cuyo principio es un inmunoensayo cromatográfico (ImmunoCard Stat Rotavirus, Meridian Bioscience Inc, Cincinnati USA). Este ensayo detecta la presencia del antígeno de rotavirus en la materia fecal. Brevemente, la muestra se diluyó en proporción 1:15 en solución salina que contiene azida de sodio como preservativo y se dejó en reposo por 30 minutos. Después se centrifugaron

las muestras a 10,000 rpm por 1 min. Luego, se aplicaron 150 μ L del líquido sobrenadante sobre la tarjeta de prueba y se dejó que migrara sobre las zonas de prueba y de control. (Figura 5.2). La muestra moviliza un anticuerpo monoclonal contra la proteína VP6 de rotavirus conjugado a partículas de oro; el que migra a lo largo de la membrana a través de las zonas de **Test** (que tiene inmovilizado un anticuerpo policlonal de conejo antirotavirus) y de **Control** (la cual contiene un

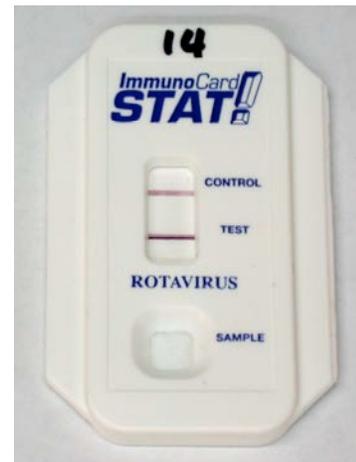


Figura 5.2 Tarjeta para detección de rotavirus tipo A

anticuerpo caprino anti Ig-G murino). En caso de que el rotavirus se encuentre presente en la muestra, se forma un complejo entre el anticuerpo de captura y el conjugado anticuerpo monoclonal-oro que puede visualizarse como una línea color rojo/morado. La línea de control asegura que la muestra haya migrado la distancia apropiada a lo largo de la membrana.

V.4 Extracción de dsRNA

A las muestras positivas para rotavirus tipo A se les extrajo el RNA viral utilizando dos métodos: Extracción química y un *kit* de extracción de RNA viral (QIAamp[®] viral RNA, QIAGEN, Westburg, Leusden, Holanda).

V.4.1 Método químico

El método de extracción química se basa en la extracción con fenol y cloroformo, con algunas modificaciones (Chomczynski y Sacchi, 1987). Las muestras de heces fecales fueron disueltas en agua formando una suspensión aproximadamente al 20%, luego centrifugadas a 8,000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue utilizado para la extracción del dsRNA viral, el *pellet* fue desechado. Se tomaron 200 µL de sobrenadante y se mezclaron con 40 µL de *buffer* disruptor (0.25 M Tris-Base, 0.075 M EDTA, 1.3% SDS, 0.68 M de NaCl y 1.3% de β-mercaptoetanol). Luego, se agregaron 200 µL de fenol saturado a pH 8.0 y se agitaron las muestras en *vortex* por 2 min., luego se agregaron 200 µL de una solución cloroformo: alcohol isoamílico (proporción volumétrica 24:1) y se agitó en *vortex* por 2 min. La mezcla fue centrifugada a 10,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se pasó a otro tubo. Dependiendo de la cantidad de impurezas de la muestra, se repitieron hasta tres veces los lavados con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Después del proceso, se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto al sobrenadante y se agitaron en *vortex* por 1 min. La muestra fue dejada a -20°C toda la noche. Luego, fue centrifugada a 10,000 rpm por 15 min a 4 °C. El etanol fue desechado y se realizó un nuevo lavado con etanol al 70% y removido de igual forma. Finalmente, el *pellet* fue secado en el evaporador centrífugo al vacío marca

Savant® por 20 min., luego fue resuspendido en 20 µL de agua libre de nucleasas. La concentración de dsRNA fue determinada por absorbancia a 260 nm y aplicando la siguiente ecuación:

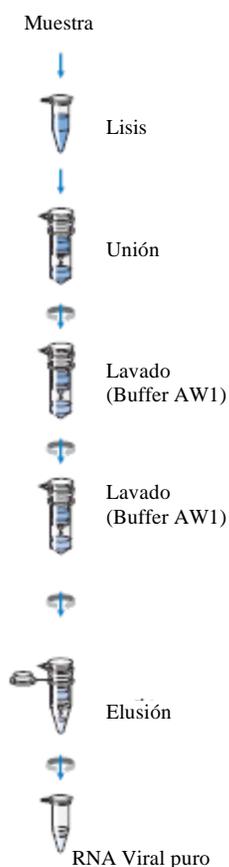
$$[\text{dsRNA}] = A_{260} * f_d * (50 \text{ ng}/\mu\text{L})^\dagger \quad (5.1)$$

donde:

[dsRNA]	Concentración de dsRNA expresada en ng/µL
A ₂₆₀	Absorbancia medida a 260 nm
f _d	Factor de dilución de la muestra leída

† El valor de 1 unidad de absorbancia a 260nm equivale a 50 ng/µL de dsRNA o dsDNA. (Sambrook *et al.*, 1989).

V.4.2 **Kit de extracción de RNA viral (QIAamp® viral RNA, QIAGEN)**



Este *kit* fue diseñado para purificar RNA viral de diferentes fuentes, entre las que se cuentan plasma, suero, orina y otros fluidos corporales libres de células. El *kit* combina las propiedades de unión selectiva a membranas de sílica gel con las de centrifugación (o con un equipo operado al vacío) y tiene la ventaja de poder procesar simultáneamente múltiples muestras.

La muestra es lisada utilizando una solución especial para este propósito (*Buffer AVL*). Este *buffer* posee altas propiedades desnaturizantes que inactivan las RNAsas y aseguran el aislamiento del RNA viral de forma intacta. Brevemente, el procedimiento fue el siguiente: Se agregaron 560 µL de *Buffer AVL* a 140 µL del sobrenadante de una solución de heces fecales al 20% y se mezclaron en *vortex* por 10 s. Se dejaron incubar las muestras con el *buffer* desnaturizante por 10 min.

Figura 5.3 Esquema general de la producción de RNA viral por Medio del kit QIAamp Viral RNA

Luego de este tiempo, se agregaron 560 μ L de etanol absoluto y se agitó en *vortex* por 15 s. Las muestras se agregaron a las columnas que contenían las membranas de sílica gel y se centrifugaron a 8,000 rpm por 1 minuto, realizando este proceso hasta que la cantidad de muestra haya pasado completamente por la columna. Luego, sobre las columnas se agregaron 500 μ L del *buffer* de lavado AW1 y se centrifugaron a 8,000 rpm por 1 min. Luego se agregaron 500 μ L del segundo *buffer* de lavado (AW2) y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min. La columna se colocó sobre un tubo *ependorf* de 1.5 mL y se agregaron sobre la membrana 60 μ L del *buffer* de elusión (AVE) dejando equilibrar a temperatura ambiente por 1 min y luego centrifugando a 8,000 rpm por 1 min. El producto eluído contenía el dsRNA de las muestras procesadas. El dsRNA se cuantificó por absorbancia (Ver V.4.1).

V.5 Identificación de los genotipos P y G por PCR

Para el proceso de identificación de genotipos se estableció una metodología denominada *multiplex* PCR que consta de 3 etapas: La primera etapa consiste en la síntesis de cDNA mediante una transcripción reversa del dsRNA genómico del virus aislado. La segunda etapa consiste en la primera amplificación por PCR del gen completo (en el caso de VP7) o un fragmento del gen (en el caso de VP4), utilizando para ello los mismos oligos utilizados en la transcripción reversa. Finalmente, la tercera etapa consiste en una segunda ronda de amplificación por PCR, en la cual se utiliza un oligo genérico en uno de los extremos del fragmento y un cóctel de oligos de tipificación específicos para los genotipos escogidos. Ya que los oligos específicos utilizados se localizan a diferentes distancias del gen, el tamaño de los productos del segundo PCR indican el genotipo de cada una de las muestras analizadas.

V.5.1 Reacción de RT- PCR

Los primeros dos pasos del proceso de genotipificación involucran reacciones de transcripción reversa del dsRNA viral y una primera amplificación por PCR de los

fragmentos de los genes de VP4 y VP7. Para realizar estos pasos, se utilizó el *kit* QIAGEN OneStep RT- PCR que contiene una combinación optimizada de las transcriptasas reversas Omniscript® y Sensiscript® y la HotStar Taq DNA polimerasa. Se evaluaron diferentes condiciones de reacción, hasta que se obtuvo el siguiente procedimiento: 0.5 µg del dsRNA viral extraído de las muestras de campo fue colocado en un tubo *ependorf* de 0.2 mL. Sobre este tubo se agregaron los dos oligos genéricos para cada segmento (2 µL de cada oligo, 15 µM). Esta mezcla fue colocada en el termociclador a 97°C por 5 minutos y luego enfriada en hielo. Sobre el tubo se agregaron 10 µL de *Buffer* 5X (Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 12.5mM de MgCl₂, DTT; pH 8.7 a 20°C), 2 µL de dNTP's 10 mM, 2 µL de la mezcla enzimática, 0.5 µL de inhibidor de RNAsas y se completó a un volumen de 50 µL con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), el cual es un inhibidor de nucleasas.

El programa de RT- PCR con el que se obtuvieron los mejores resultados para la amplificación de los fragmentos de los genes de VP4 y VP7 fue el siguiente:

Tabla 5.1 Condiciones del proceso de RT - PCR

	Condiciones	Número de ciclos
Cantidad de RNA	0,5 µg	-
Transcripción Reversa	50°C, 30 min	1
Activación de HotStarTaq® DNA Pol	95°C, 15 min	1
Desnaturalización	94 °C, 1 min	30
Alineamiento	55°C, 1 min	30
Extensión	72 °C, 2 min	30
Extensión final	72 °C, 10 min	1
Final	Refrigeración	-

V.5.2 Reacción de *multiplex* PCR

La segunda ronda de amplificación utiliza un oligo genérico común para todas las amplificaciones y tres oligos de genotipificación específicos, que se ubican en zonas hipervariables del gen a amplificar. El procedimiento fue básicamente una reacción de PCR, en la que se agregó 1 μ L de templado proveniente de la reacción de RT-PCR, 30 pmol de un oligo genérico y 30 pmol del coctel de oligos de genotipificación, además, se agregaron 2.5 μ L de *buffer* Thermopol (10mM KCl, 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris-HCl, 2 mM de MgSO_4 , 0.1% Tritón X-100, pH 8.8 a 25°C), 1 μ L de dNTP's 10 mM, 2 U DNA Taq polimerasa y se completó hasta un volumen de 25 μ L con agua DEPC.

Las condiciones del multiplex PCR se resumen a continuación:

Tabla 5.2 Condiciones del proceso de multiplex PCR

	Condiciones	Número de ciclos
Cantidad de templado del RT PCR	1 μ L	-
Cantidad de oligo genérico	30 pmol	-
Cantidad de coctel de genotipificación	30 pmol	-
Cantidad de Taq Polimerasa	2 U	-
Cantidad de dNTP's	5 pmol	-
Desnaturalización inicial	94°C, 10 min	1
Desnaturalización	94 °C, 1 min	30
Alineamiento	54°C, 1 min	30
Extensión	72 °C, 1 min	30
Extensión final	72 °C, 10 min	1

V.5.2.1 Determinación de genotipos G

La identificación de los genotipos G se realizó utilizando en la primera ronda de amplificación un par de oligos genéricos Bov9Com5 y Bov9Com3, (Ver tabla 5.3) (Isegawa *et al.*, 1993), la cual amplifica 1011 pb del gen de VP7. Para la segunda

amplificación por PCR (*Multiplex PCR*) se utilizó el oligo genérico 5' Bov9Com5 y un cóctel de oligos de tipificación específicos para G6, G8 y G10. Los tamaños de cada uno de los productos esperados de la segunda amplificación se esquematizan en la fig. 5.4. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.0%, con 0.5 mg/mL de bromuro de etidio y visualizados con luz UV.

Tabla 5.3 Oligos usados para amplificar el gen completo de VP7 y para genotipificación tipo G del rotavirus bovino grupo A

Nombre del oligo	Secuencia del oligo	Localización en el gen	Producto obtenido
Bov9Com5	5'>TGTATGGTATTGAATATACCAC< 3'	50-71	1011pb
Bov9Com3	5'>TCACATCATACTCTAATCT< 3'	1,039-1,060	1011pb
G6	5'>CTAGTTCCTGTGTAGAATC<3'	499-481	450 pb
G8	5'>CGGTTCCGGATTAGACAC<3'	273-256	224 pb
G10	5'>TTCAGCCGTTGCGACTTC< 3'	714-697	665 pb

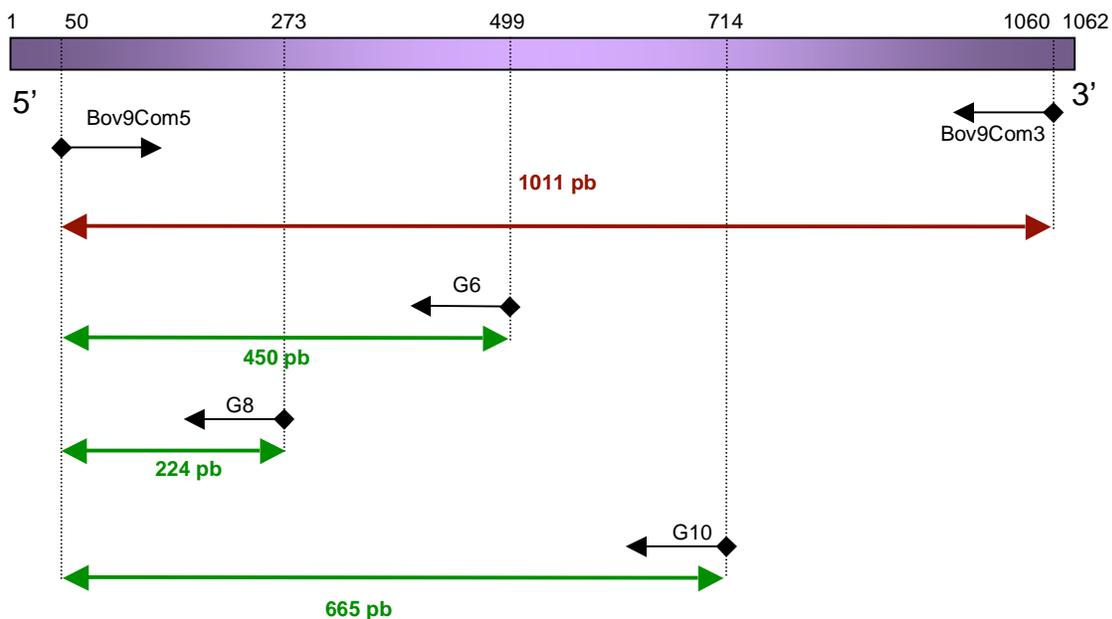


Figura 5.4 Esquema del segmento 9 del genoma de rotavirus. Se observan las posiciones de los oligos y los tamaños esperados de los productos de la amplificación.

V.5.2.2 Determinación de genotipos P

Para la amplificación el fragmento del segmento 4 de rotavirus, se utilizaron dos estrategias reportadas en la literatura (Gouvea *et al.*, 1994, Isegawa *et al.*, 1993). La primera estrategia denominada estrategia BOV usa un juego de oligos genéricos (Bov4Com5 y Bov4Com3) que amplifica un fragmento de 856 pb del segmento 4 del genoma de rotavirus y un juego de tres oligos de tipificación para P[1], P[5] y P[11]. La segunda estrategia, denominada estrategia CON utiliza como oligos genéricos Con2 y Con3 y como oligos de tipificación los oligos Con(P1), Con(P5) y Con(P11) (Tabla 5.4). A partir de esta información se propuso una tercera estrategia (HYBR) que mezcla los oligos genéricos Bov4Com3 y Con3 que amplifican un segmento de 1919 pb y los oligos de tipificación de la estrategia CON. Los productos de las amplificaciones de las tres estrategias se esquematizan en la fig. 5.5.

Tabla 5.4. Oligos usados para amplificar un fragmento del gen de VP4 y para genotipificación tipo P del rotavirus bovino grupo A

Nombre del oligo	Secuencia del oligo	Localización en el gen	Producto obtenido
Bov4Com5	5'>TTCATTATTGGGACGATTCACA< 3'	1067-1088	856 pb
Bov4Com3	5'>CAACCGCAGCTGATATATCATC< 3'	1930-1909	856 pb
P1	5'>TTAAATTCATCTCTTAGTTCTC< 3'	1526-1505	460 pb
P5	5'>GGCCGCATCGGATAAAGAGTCC< 3'	1725-1704	659 pb
P11	5'>TTCAGCCGTTGCGACTTC< 3'	1398-1377	332 pb
Con3	5'>TGGCTTCGCTCATATACAGACA< 3'	11 - 32	876 pb
Con2	5'>ATTTCCGGACCATTTATAACC < 3'	868 - 887	876 pb
Con(P1)	5'>CGAACGCGGGGTGGTAGTTG < 3'	269 - 289	622 pb
Con(P5)	5'>GCCAGGTGTGCGCATCAGAG < 3'	336 - 354	555 pb
Con(P11)	5'>GGAACGTATTCTAATCCGGTG < 3'	574 - 594	314 pb

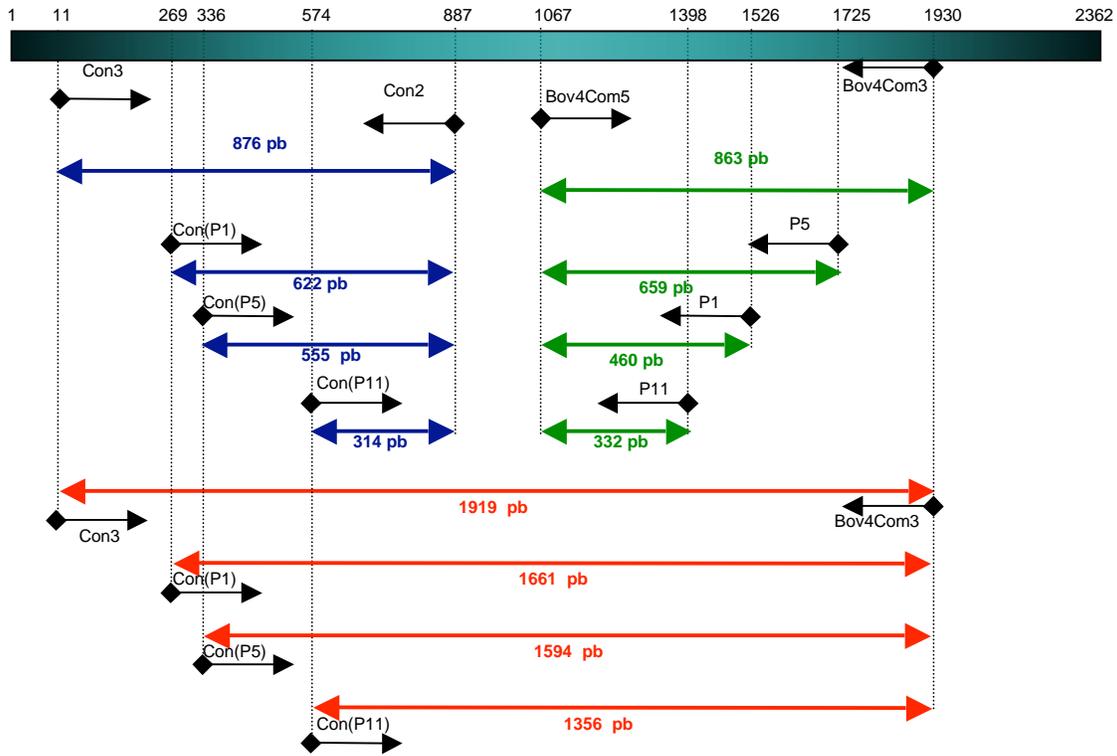


Figura 5.5 Esquema del segmento 4 del genoma de rotavirus. Se observan las posiciones de los oligos y los tamaños esperados de los productos de la amplificación. La estrategia CON y sus productos se esquematizan en azul, la estrategia BOV en verde y la estrategia HYBR en rojo.

V.6 Líneas celulares y técnicas de cultivo

Se trabajó con las líneas celulares del insecto *Trichoplusia ni* Tn5B1-4 (High Five[®] o H5) y Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Se usó el medio de cultivo libre de suero SF900-II (Invitrogen). Se cultivaron en matraces de 250 mL (con volumen de trabajo de 60 mL) en agitación a 100 rpm y 27°C. La concentración y tamaño celular se determinaron utilizando el contador de partículas Coulter (Coulter Electronics). La viabilidad celular se determinó utilizando cámara de Neubauer y realizando tinción con azul de tripano. Para el proceso de construcción de baculovirus recombinantes se utilizaron placas de 6 pozos, medio de cultivo Grace (Gibco) y medio TnMFH con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Ver anexo F). La metodología del proceso de transfección se explica en detalle en el numeral V.9.4.

V.7 Confirmación de resultados por análisis de secuencias

Para corroborar los resultados obtenidos en el proceso de genotipificación, se tomaron productos del multiplex PCR de cada uno de los genotipos encontrados. Estos productos fueron purificados usando columnas comerciales (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean Up System, Promega) y enviados a la Unidad de Secuenciación del IBt-UNAM en una mezcla de DNA/oligo (0.5 µg DNA/15 pmol oligo) en un volumen de 16µL. La secuenciación automatizada de DNA usa el método: *Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence - Based Sequencing* y los resultados se reciben en formato electrónico. El análisis de datos se realizó visualizando las secuencias con el *software* Chromas (Technelysium Pty, Ltd) y realizando un análisis de similitud de secuencias "BLAST" (Altschul *et al.*, 1997).

V.8 Vector de expresión

Se utilizó el nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*. Los baculovirus recombinantes que codifican para las proteínas de VP7 fueron construidos a partir de los genotipos G prevalientes en las muestras de heces fecales analizadas. Los genes de estas proteínas fueron extraídos directamente de las muestras de campo.

V.8.1 Amplificación de genes para clonación en el vector pCR[®]8

Se utilizó el *kit* de clonación pCR[®]8/GW/TOPO[®]TA (Invitrogen, Corp), que permite insertar un producto de PCR amplificado con Taq DNA polimerasa en un vector linearizado pCR[®]8/GW/TOPO[®] (ver Anexo E), que contiene extremos cohesivos 3' timidina (T) para clonación y Topoisomerasa I del virus vaccinia covalentemente unida al vector, la cual permite una ligación con una eficiencia del 95%. (Ver figura 5.6)

En general, se realizó una reacción de PCR con la enzima *Taq* polimerasa convencional la cual deja productos con extremos cohesivos sencillos 3' A. Para ello se utilizaron oligos específicos para amplificar toda la región codificante de los genes de VP4 y VP7. En el caso de VP7, los oligos utilizados fueron Bov9Com5 y Bov9Com3 (Ver tabla 5.3).

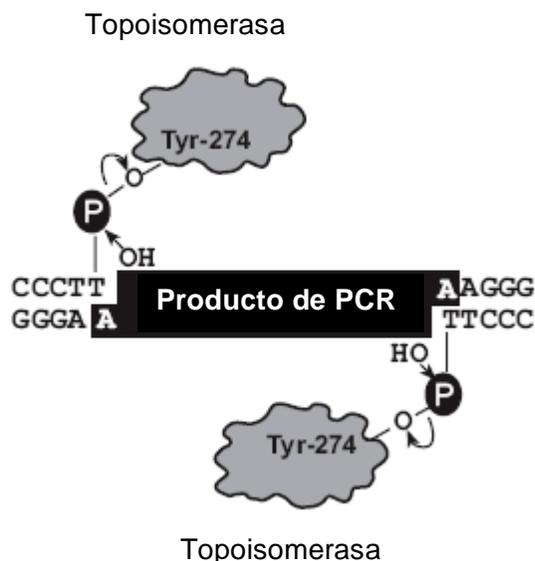


Figura 5.6 Fundamento de la clonación con Topoisomerasa I

Para amplificar el gen completo de VP4 (segmento 4 de rotavirus) fue necesario realizar un análisis de secuencias de diferentes cepas de rotavirus bovinos y establecer los oligonucleótidos que más se ajustaban a las secuencias consenso disponibles en la red. También se utilizaron los oligos YM diseñados por el grupo de la Dra. S. López (IBt-UNAM). A continuación se muestran las secuencias de los oligos utilizados:

Tabla 5.5 Oligos para amplificación del gen completo de VP4

Nombre	Secuencia
VP4BEG5'	5'> GGCTWTAWAATGGCTTCGCTMATAT >3'
VP4END3'	5'> GGTCACATCCTCACASAARCWGCTC >3'
YM4-5'	5'> CAGACCCGGGTACCTATAAAATGGCTTCGCTC >3'
YM4-3'	5'> CAGACCCGGGCCGCGGTACACAACCTCGAGACAC >3'

W=A/T, M=A/C, S=C/G, R=A/G

Estos oligos fueron utilizados en una reacción de RT PCR de 50 μL . Los componentes y condiciones de la reacción fueron similares a los utilizados para la amplificación de cada uno de los genes y fueron descritos en numeral V.5.1. La reacción de PCR tuvo un tiempo de extensión final de 30 minutos para asegurar que todos los productos de la reacción estén adenilados en el extremo 3'.

Se montaron geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio para verificar la calidad del producto de PCR, verificando que la amplificación generara una única banda correspondiente al tamaño esperado del gen. El producto de PCR fue utilizado para iniciar el proceso de clonación en el vector de entrada **pCR[®]8**.

V.8.2 Reacción TOPO[®] cloning

El producto de PCR de la etapa anterior fue utilizado para realizar la reacción de clonación en vectores TOPO[®]. Las cantidades de reactivos utilizados en este proceso fueron las siguientes:

Tabla 5.6 Reacción de clonación de vectores TOPO[®]

Reactivo	Cantidad
Producto fresco de PCR	0,5 a 4 μL
Solución de sales*	1 μL
Agua libre de nucleasas	completar a 5 μL
Vector pCR [®] 8	1 μL
Volumen final	6 μL

* 1.2M NaCl, 0.06 M MgCl₂

La mezcla de estos reactivos se dejó incubar por 30 minutos a 22-23°C, luego se llevó a hielo. Este tiempo fue suficiente para que la Topoisomerasa I del vector ligara eficientemente el gen de interés.

V.8.3 Transformación de células competentes de *E. coli*

Una vez que se realizó la reacción de clonación en el vector pCR[®]8 TOPO[®], la construcción resultante se introdujo en células ultracompetentes *E. coli* Mach1[™]-T1[®], utilizando el protocolo suministrado por el fabricante. Brevemente, se adicionaron 2 µL de la reacción de clonación TOPO[®] en un vial de células químico competentes de *E. coli*, se incubaron en hielo por 30 minutos y luego se sometieron a choque térmico por 30 segundos a 42°C regresándolas inmediatamente después al hielo. Luego, se adicionaron 250 µL de medio SOC previamente estabilizado a temperatura ambiente. El vial fue cerrado herméticamente y se colocó de forma horizontal en una incubadora a 37°C por 1 hora a 250 rpm.

Luego de este tiempo, se sembraron 10 y 50 µL de células de este vial en cajas de medio LB-Agar que contenían espectinomicina en una concentración de 100 µg/mL. La espectinomicina permite la selección del plásmido recombinante. Estas cajas fueron incubadas a 37°C toda la noche.

V.8.4 Análisis de transformantes

Se escogieron 4 colonias de las cajas sembradas la noche anterior y se incubaron toda la noche en 5 mL de medio LB que contenía 100 µg/mL de espectinomicina.

Se aislaron los plásmidos de este cultivo utilizando el *kit* QIAprep[®] spin minipreps (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del proveedor.

V.8.4.1 Análisis por enzimas de restricción

Se utilizaron enzimas de restricción específicas para verificar la presencia del inserto en la construcción. Para ello se usó la enzima EcoRI que flanquea el vector en la zona de clonación y genera al menos dos fragmentos: uno del tamaño del

gen (si este no tiene sitios EcoRI internos) y uno de aproximadamente 2800 pb que corresponde al tamaño completo del vector sin clonar. También se usó la enzima XhoI que solo presenta un corte en la construcción completa y lineariza el vector, dando como resultado una única banda.

V.8.4.2 Orientación del gen

Para corroborar la orientación del gen, se realizó una reacción de PCR usando como templado el plásmido aislado mediante *minipreps* y dos oligos específicos: uno presente en el vector (GW2) y otro presente en el extremo 5' del gen clonado. El producto de PCR obtenido debe tener 75 pb más que el gen clonado y las clonas que amplifican correctamente este fragmento contienen el gen en la dirección correcta.

V.8.4.3 Análisis de secuencias

Finalmente, se corroboró la construcción mediante la secuenciación del gen clonado. Para ello, se utilizaron los mismos oligos usados para verificar la orientación del gen y el protocolo descrito en el numeral V.7.

V.8.5 Reacción de recombinación LR

Esta tecnología denominada Gateway[®] (Invitrogen corp.) es un método de clonación que toma ventaja de las propiedades de recombinación sitio-específica del bacteriófago lambda (Landy, 1989) para proveer una ruta rápida para mover el gen de interés en sistemas de múltiples vectores (por ejemplo: bacterias, células de mamífero, células de insecto o levaduras).

La construcción obtenida en el vector de entrada pCR[®]8 se somete a una reacción de recombinación sitio-específica que utiliza vectores de destino característicos. En nuestro caso se escogió el vector pDEST[®]8, el cual es un plásmido de 6526

pb y cuenta con genes de resistencia a ampicilina y gentamicina (Ver Anexo E). El vector cuenta con el promotor de poliedrina y requiere que el gen insertado contenga los codones de inicio y término. La reacción de recombinación se realiza utilizando un coctel enzimático que contiene una mezcla de integrasa (Int) y excisionasa (Xis) de bacteriófago λ y el factor de integración del hospedero de *E. coli* (IHF). La reacción se llevó a cabo de la siguiente forma:

En un tubo *Eppendorf* de 0.6 mL se mezclaron 2.5 μ L del vector de entrada que contiene el gen de interés (equivalente a 150 ng de plásmido), 1 μ L del vector de destino pDEST[®]8 (150 ng) y 5.0 μ L de *buffer* TE pH 8.0. A esta mezcla se le agregaron 2 μ L de LR clonase II (coctel enzimático) y se incubó por 1 hora a 25°C. Luego de este tiempo, la reacción se detuvo agregando 1 μ L de proteinasa K y subiendo la temperatura a 37°C por 10 min. El producto obtenido fue refrigerado a 4°C para su posterior utilización.

V.8.6 Transformación de células químico competentes de *E. coli*

La reacción de recombinación LR se utilizó para transformar células de *E. coli* Mach1[™]-T1^R. De manera general, el protocolo seguido fue el siguiente: Se tomó 1 μ L de reacción de recombinación LR y se agregó a un tubo que contenía 50 μ L de células Mach1[™]-T1^R, mezclando suavemente sin pipetear. Esta mezcla fue incubada en hielo por 30 minutos. Después de este tiempo se sometió a choque térmico por 30 s a 42°C. Inmediatamente después, se transfirieron los tubos a hielo y se les agregó 450 μ L medio SOC que se encontraba a temperatura ambiente. Esta mezcla se incubó por 1 hora a 37°C y 200 rpm. Se tomaron 20 y 100 μ L de cada reacción y se sembraron en cajas de LB Agar que contenían 100 μ g/mL de ampicilina. Se dejaron incubando toda la noche a 37°C.

V.8.7 Análisis de transformantes

Se escogieron 5 colonias y se cultivaron toda la noche en medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina.

Las colonias que crecieron en medio LB-Amp se verificaron en cajas con LB agar que contenían 30 µg/mL de cloranfenicol. Las colonias positivas para cada uno de los genes deben ser resistentes a ampicilina y sensibles a cloranfenicol.

La mañana siguiente se aisló el DNA plasmídico de las clonas verdaderas utilizando el *kit* QIAprep[®] spin minipreps (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del proveedor.

V.8.7.1 Análisis por enzimas de restricción

Para verificar la transformación de las células escogidas, se realizó un análisis de restricción con EcoRI. Se esperaba una banda alrededor de 4750pb y otra banda del tamaño del gen (si éste no contiene sitios EcoRI internos).

Las clonas escogidas en este proceso fueron utilizadas para realizar la transformación de células ultracompetentes de *E. coli* DH10Bac[®].

V.9 Construcción de baculovirus recombinantes

Se utilizó el sistema de expresión Bac-to-Bac[®] (Invitrogen corp.), el cual es un sistema de transposición sitio-específica que genera baculovirus de alto nivel de expresión de proteínas recombinantes. Los principales componentes del sistema Bac-to-Bac[®] son los siguientes:

- Un plásmido donador, en nuestro caso pDest®8. Sus características principales se encuentran descritas en detalle en el anexo E.
- Una cepa hospedera de *E. coli*, DH10Bac®, que contiene un vector transportador de baculovirus (bácmido parental bMON14272) y un plásmido auxiliar (pMON7124). El bácmido parental contiene un replicón mini-F, un gen de resistencia a kanamicina, un sitio *attTn7* y el factor de complementación *lacZ α* . El plásmido auxiliar contiene la región *tnsABCD* que provee las proteínas de transposición requeridas para inserción del sitio mini-Tn7 desde el plásmido donador en el sitio blanco del bácmido parental. Estas dos construcciones permiten la generación del baculovirus recombinante.

Los pasos requeridos para expresar el gen de interés en el sistema Bac-to-Bac® son los siguientes:

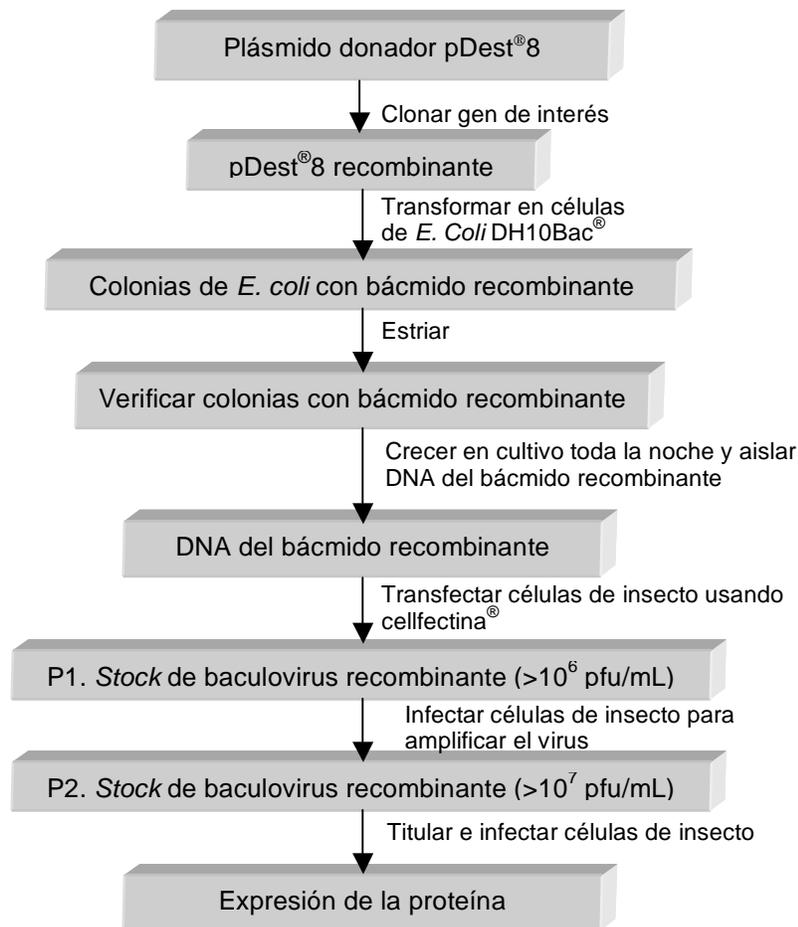
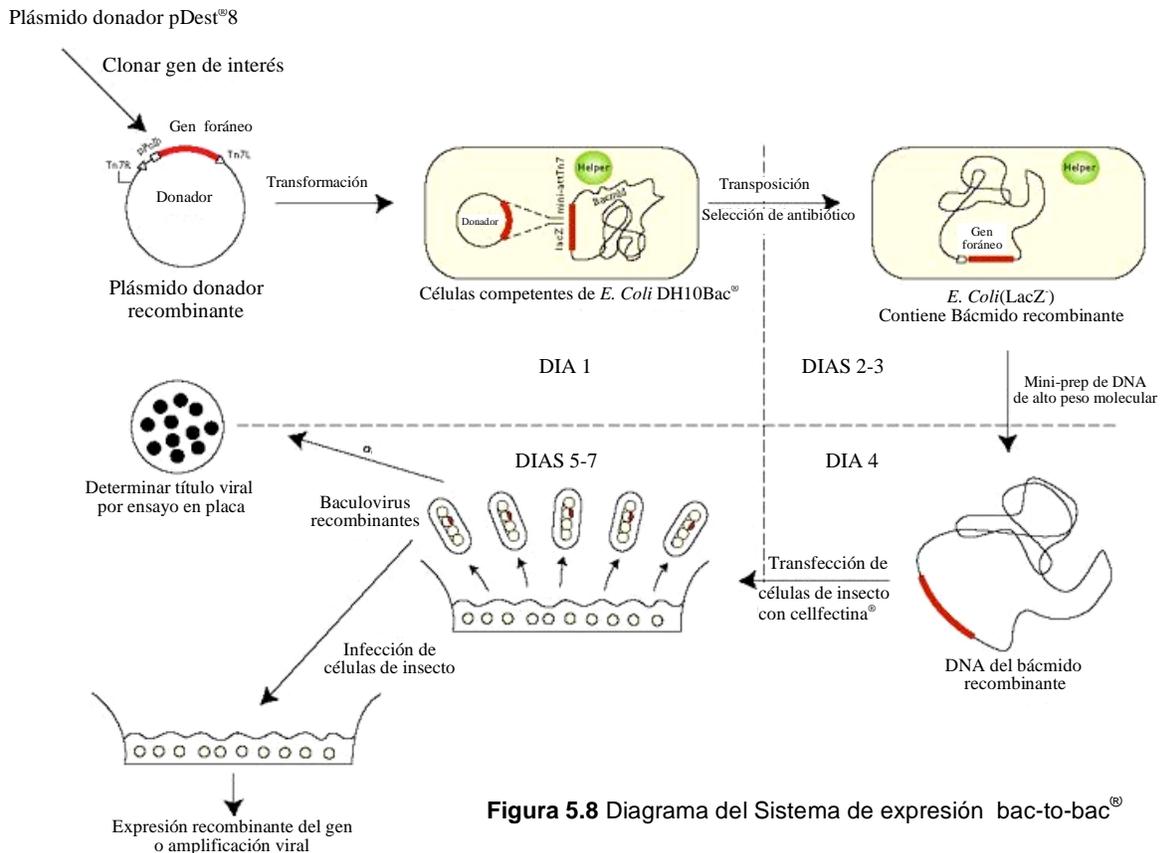


Figura 5.7 Pasos para la expresión de proteínas recombinantes en el sistema bac-to-bac®

El diagrama general del proceso y los tiempos según el fabricante se muestran en la figura 5.8:



V.9.1 Transformación de células ultracompetentes de *E. coli* DH10Bac[®]

La reacción de transformación de células DH10Bac[®] se realizó de la siguiente forma:

Se descongelaron en hielo 100 μ L de células DH10Bac[®] que se encontraban a -70 $^{\circ}$ C y se agregaron 5 μ L de plásmido pDEST[®]8 con la construcción (aprox. 1 ng). Se incubó en hielo esta reacción por 30 min. Posteriormente, se realizó choque térmico a 42 $^{\circ}$ C por 45 s y se llevó de nuevo a hielo por 2 minutos. Se agregaron 900 μ L de medio SOC y se incubó la reacción a 37 $^{\circ}$ C por 4 horas a 225 rpm.

Se sembraron 100 μL de esta reacción en cajas de LB-Agar que contenían 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de X-Gal y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IPTG. Se dejaron incubando las cajas durante 48 horas a 37°C. Las colonias transformadas que contienen el b́acmido recombinante deben ser de color blanco, las no transformadas serán de color azul.

V.9.2 Verificación de fenotipo

Se escogieron 10 colonias blancas de las cajas anteriores y se re-estriaron en nuevas cajas de LB-agar que contenían 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de X-Gal y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IPTG. Se dejaron incubando a 37°C toda la noche. Se verificó que la colonia reestriada tuviera un fenotipo blanco. Se desecharon las colonias que presentaron mezcla de fenotipos blanco-azul.

Se escogieron clonas blancas y se sembraron en LB líquido que contenía 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina. Se dejaron crecer toda la noche y se aisló del cultivo el b́acmido recombinante usando el *kit* High Purity Plasmid Midiprep system (Marligen, biosciences Inc.), siguiendo las indicaciones del proveedor.

V.9.3 Análisis del b́acmido recombinante por PCR

El DNA del b́acmido recombinante es de un tamaño mayor a las 135 kb. Ya que el análisis por enzimas de restricción es muy difícil para un DNA tan grande, se escogió el uso del PCR para verificar la presencia del gen de interés en el b́acmido. El b́acmido contiene los sitios M13 *forward* (-40) y M13 *reverse* flanqueando los sitios *mini-attTn7*. Se diseñó una reacción de PCR que utilizaba un oligo 5' del gen de interés y el oligo M13 *reverse* (Fig. 5.9). Las cantidades de reactivos para la reacción de PCR se muestra en la tabla 5.7.

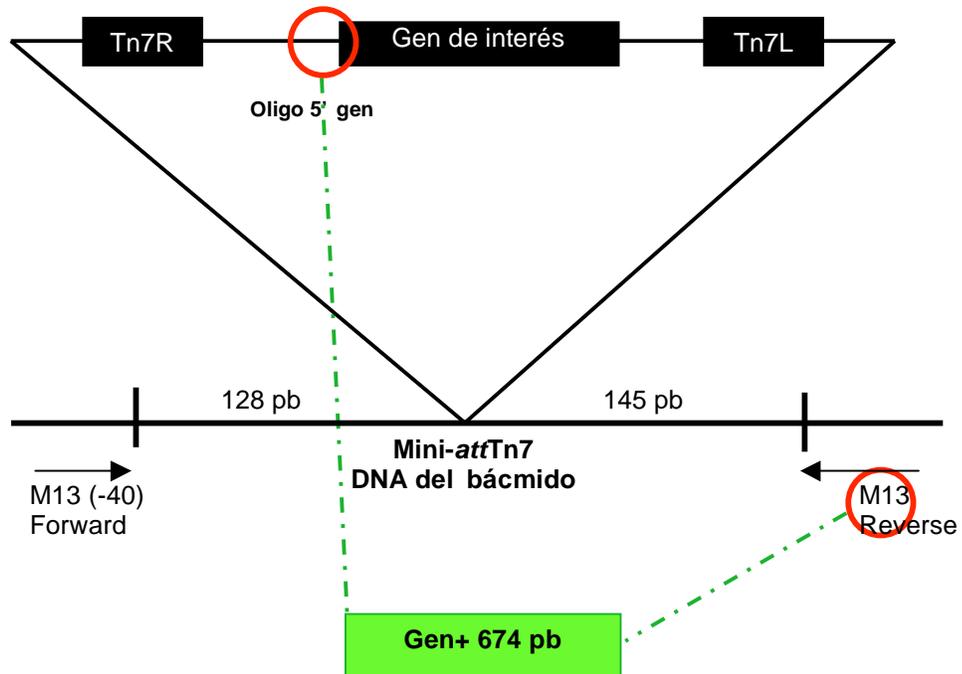


Figura 5.9 Estrategia para verificación del báculo recombinante

Tabla 5.7 Reacción de PCR para verificar báculo recombinante

Reactivo	Cantidad
Báculo recombinante	1 μ L
Buffer Thermopol 10X	5 μ L
dNTP's 10 mM	2 μ L
MgCl ₂ 50 mM	2 μ L
Oligo 5' (15 mM)	2 μ L
M13 reverse (15 mM)	2 μ L
Agua	35 μ L
Taq polimerasa	1 μ L
Volumen final	50 μL

El programa utilizado fue el siguiente:

Tabla 5.8 Programa de PCR para verificar b acmido recombinante

Etapa	Temp	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	93�C	3 min	1
Desnaturalización	94�C	45 s	30
Alineamiento	55�C	45 s	30
Extensión	72�C	5 min	30
Extensión final	72�C	7 min	1

Los productos de PCR de esta reacción fueron 674 pb más grandes que el tamaño del gen original, lo cual se esperaba ya que incluían parte de la secuencia del DNA del b acmido. Estos productos se verificaron usando geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

V.9.4 Transfección de células de insecto

En una placa de 6 pozos, se sembraron células Sf9 en crecimiento exponencial con viabilidad mayor al 98%, que fueron crecidas previamente en medio TnM-FH con suero fetal bovino (FBS) al 10% (ver anexo F). La concentración celular fue de 2×10^6 células/pozo. Se dejaron por 1 hora a 27 C para permitir que se adhirieran completamente a la superficie, formando una monocapa uniforme.

Aparte en un tubo de 1.5 mL se mezclaron cuidadosamente 100 μ L de b acmido recombinante (aprox. 5 μ g) con 1.0 mL de Medio Grace para células de insecto (Gibco, BRL) (sin FBS) y 20 μ L de reactivo Cellfectina[ ] (Invitrogen, corp). Esta mezcla se dejó incubando por 45 min a temperatura ambiente.

Mientras terminaba la incubación, se removió el medio de las células Sf9 sin mover la monocapa y se lavaron las células añadiendo 2 mL de medio Grace (sin FBS), añadiendo cuidadosamente en el centro del pozo. Nuevamente se removió el medio adicionado y se añadió la mezcla de transfección antes preparada, distribuyendo uniformemente por toda la monocapa sin alterarla.

Las placas se dejaron incubando a 27°C por 4 horas. Luego de este tiempo, se añadió 1.0 mL de medio TnM-FH (10% FBS) en cada pozo y se incubaron a 27°C por 3-4 días.

Después de 72 horas, se cosechó el sobrenadante de las transfecciones donde se encuentran los baculovirus recombinantes. Este es el primer *stock* viral que fue utilizado para amplificar el virus y para expresar las proteínas de interés.

V.9.5 Expresión de las proteínas recombinantes

Para verificar la expresión de las proteínas recombinantes se realizó una prueba de Western Blot que identifica de forma independiente las proteínas VP7 de rotavirus y GP64 de baculovirus. GP64 es una glicoproteína de membrana de baculovirus, la cual se produce tanto en las fases tempranas como tardías de la infección y sirve como control para verificar la producción de baculovirus al final del proceso de transfección. Para la verificación de GP64 se utilizaron las células al final de la transfección y para VP7 se usaron los sobrenadantes del mismo proceso. Se realizaron geles de SDS-PAGE al 10%, a corriente constante de 15mA durante 1 hora 15 min. Luego de este paso, se realizó la técnica de Western Blot, transfiriendo las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, usando para ello la técnica de transferencia semihúmeda (*buffer* de transferencia 10 mM glicina, 10% metanol, 25mM Tris-base) a 200 mA por dos horas. Los anticuerpos utilizados para detectar GP64 fueron: ratón antiGP64 FastPlax[®] (1:10,000) y antiratón peroxidasa (1:2,000). Los anticuerpos usados para identificar las proteínas de rotavirus fueron: Conejo anti-rotavirus YM (1:1,000) y anticonejo peroxidasa (1:2,000). Las membranas fueron reveladas con solución de carbazol: 4.5 mL de solución de carbazol (0.8% en dimetilformamida), 12.5 mL de *buffer* de acetatos 0.05M a pH 5.0 y 30 μ L peróxido de hidrógeno al 30%.

V.10 Transcripción *in vitro*

Debido a las dificultades presentadas para amplificar el gen de VP4 de las cepas de campo escogidas (genotipos P[5] y P[11]) a partir de dsRNA, se decidió amplificar a partir de mRNA, para lo cual se decidió utilizar la técnica de transcripción *in vitro*. Esta técnica utiliza partículas virales de doble capa (DLP), las cuales cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para producir nuevas moléculas de mRNA al agregar una mezcla de nucleótidos y un *buffer* de transcripción específico. Para ello, hubo necesidad de aislar las partículas virales de rotavirus bovino a partir de las muestras de heces fecales.

V.10.1 Purificación de partículas virales

Se tomaron 5 mL de muestra líquida de heces fecales y se llevaron a 15 mL con *buffer* TNC (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂), se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar por 10 minutos. Luego, se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 min y se colectó el sobrenadante. Se colocó el sobrenadante en tubos Beckman[®] para ultracentrífuga (rotor SW28) y se agregaron 1.5 mL de solución de sacarosa al 35% en *buffer* TNC al fondo del tubo permitiendo que se formaran dos fases. Las muestras fueron colocadas en el rotor SW28 y ultracentrifugadas por 90 min a 25,000 rpm y 4°C. El sobrenadante de la etapa anterior fue desechado y el *pellet* fue resuspendido en *buffer* PBS con 0.05% de azida de sodio y se mantuvo refrigerado a 4°C para su uso posterior.

Las muestras provenientes del colchón de sacarosa fueron purificadas por gradiente de cloruro de cesio: Se pesaron 1.89 g de CsCl y se agregaron a cada tubo de ultracentrífuga (Beckman[®] de 13 x 51mm), luego se adicionó el producto proveniente del gradiente de sacarosa y se completó a 4.5 mL de volumen con *buffer* TNC, se agitó hasta homogenizar la muestra. Se utilizó el rotor SW 55 TI, centrifugando las muestras a 35,000 rpm por 18 h a 4°C. Después de este tiempo, se colectaron las dos bandas opalescentes que se formaron. Estas muestras

fueron desaladas por ultracentrifugación, agregando 10 mL de *buffer* PBS filtrado por membrana de 0.22 μm y utilizando el rotor SW28 a 25,000 rpm por 2.5 h a 4°C. El *pellet* fue resuspendido en *buffer* Tris 50mM a pH 8.0 (302.8 g de Tris base en 50 mL de agua y ajustado con HCl 2N). La muestra fue almacenada a -20°C hasta su utilización.

V.10.2 Reacción de transcripción *in vitro*

La reacción de transcripción se montó como sigue:

50 μL de DLP (banda inferior del gradiente)

200 μL de *Buffer* de transcripción 2X (tris 70mM, NaOAc 100mM, MgOAc 20mM)

40 μL de bentonita

110 μL de Agua libre de nucleasas

50 μL de solución de nucleótidos (ATP 8 mM, GTP 2.5 mM, CTP 2.5 mM, UTP 2.5 mM, S-Adenosil-metionina (SAM) 0.9 mM)

La reacción se llevó a cabo a 42°C por 6 horas. Luego de este tiempo, se centrifugó la muestra y se tomó el sobrenadante. El *pellet* de bentonita contiene las DLP que pueden ser utilizadas en un proceso posterior de transcripción agregando nuevamente nucleótidos y *buffer* de transcripción. El sobrenadante fue purificado agregando la misma cantidad en volumen de fenol a pH 8.0, se agitó vigorosamente y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm. Se tomó la fase superior de esta reacción y se agregó en un nuevo tubo. Sobre el nuevo tubo se adicionó un volumen igual de cloruro de litio 4M y se dejó incubando a 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se centrifugó la reacción por 15 minutos a 14,000 rpm y 4°C. El *pellet* obtenido se lavó con 200 μL de etanol puro, se centrifugó por 10 min a 14,000 y se lavó con 200 μL de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 10 min. El *pellet* obtenido se resuspendió en 100 μL de agua libre de nucleasas con 1 μL de inhibidor de RNAsas. Se almacenó para su posterior utilización a 4°C.

V.10.3 Reacciones de RT PCR

La reacción de RT PCR se llevó a cabo cómo se explicó anteriormente en el numeral V.5.1, modificando la temperatura inicial de la reacción de RT de 97°C (dsRNA) a 70°C (mRNA). Las demás condiciones del proceso fueron las mismas usadas para el proceso de genotipificación de VP4. Los productos de reacción de RT PCR fueron verificados por geles de agarosa al 1%, teñidos con Bromuro de etidio.

Capítulo VI

Resultados y Discusión

VI.1 Determinación de rotavirus grupo A

VI.1.1 Caracterización del *kit*

El paso inicial fue caracterizar el *kit* inmunocromatográfico. Según el fabricante, el límite inferior del *kit* de detección es de 1.8×10^6 partículas de rotavirus SA11 por volumen de prueba (150 μ L). Para hacer la determinación, se utilizó proteína recombinante de VP6 de rotavirus producida en CI-BV, la cual fue purificada y cuantificada en el laboratorio. Se realizaron diluciones de la proteína para obtener concentraciones de 10 μ g/mL, 1 μ g/mL y 100 ng/mL. Se usó como control negativo proteína recombinante VP2 de rotavirus, la cual no reacciona con el anticuerpo antiVP6 que se encuentra en la membrana. A continuación se muestran los resultados obtenidos:

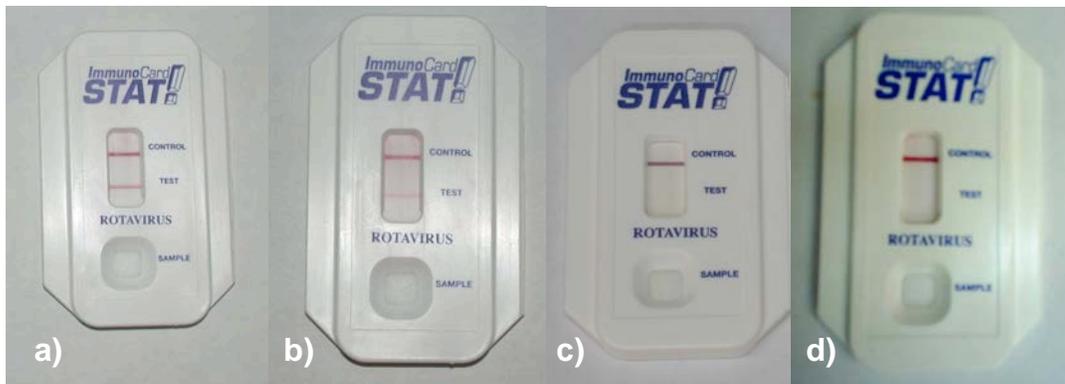


Figura 6.1 Capacidad de detección del *kit* immunocard Stat, a diferentes concentraciones de VP6 a) 10 μ g/mL, b) 1 μ g/mL, c) 100 ng/mL d) Negativo con la proteína recombinante de VP2

Se observó que la detección fue satisfactoria hasta 1 µg/mL de VP6, ya que la muestra de 100 ng/mL no presentó bandedo. La muestra usada como control negativo se comportó de forma adecuada.

Haciendo el cálculo para obtener el número de partículas de rotavirus que corresponden a esta concentración de proteína (1 µg/mL) y sabiendo que para cada ensayo se usaron 150 µL tenemos:

Datos:

Peso Molecular VP6: 44500 Da

Número de moléculas de VP6 por virus: 780

Peso Molecular de las 780 moléculas de VP6 en un mol de virus: 34.7×10^6 Da

PM virus completo: 86.8×10^6 Da

Peso de una partícula viral: 1.42×10^{-16} g/partícula

Peso de VP6 en la partícula viral: 5.76×10^{-17} g/partícula

Relación VP6/Virus completo: 0.3998

Cantidad de proteína mínima detectada en la prueba: 0.150 µg (1.5×10^{-7} g)

Cálculos:

$$\text{Peso (g) virus} = \text{Cantidad mín de VP6 detectada (g)} / \text{Relación VP6/Virus} \quad (6.1)$$

$$\text{Peso virus} = 1.5 \times 10^{-7} \text{ g} / 0.3998$$

$$\text{Peso virus} = 3.75 \times 10^{-7} \text{ g}$$

$$\text{Número de partículas virales} = \text{Peso (g) virus} / \text{peso de una partícula viral (g)} \quad (6.2)$$

$$\text{Número de partículas virales} = 3.75 \times 10^{-7} \text{ g} / 1.42 \times 10^{-16} \text{ g}$$

$$\text{Número de partículas virales} = 2.64 \times 10^9 \text{ partículas}$$

Realizando el cálculo inverso para determinar la cantidad mínima teórica de VP6 que detecta el *kit*, tenemos:

Numero de partículas mínimas virales reportadas en el *kit*: 1.8×10^6 partículas

Peso (g) partículas virales: 1.8×10^6 partículas * 1.42×10^{-16} g

Peso (g) partículas virales: 2.56×10^{-10} g

VP6 teórica: 2.56×10^{-10} g * 0.3998

VP6 teórica detectable: 10.2 ng

La capacidad de detección encontrada es de 2.64×10^9 partículas (en un volumen de prueba de 150 μ L), que contrasta con el valor de 1.8×10^6 partículas de virus que reporta el *kit*. Aunque se están comparando partículas virales vs. proteína VP6, estos resultados nos dan una idea preliminar de la sensibilidad de la prueba. Además, el valor obtenido es muy inferior a los valores de cargas virales reportadas en muestras de heces fecales, los cuales típicamente son superiores a 10^{11} pfu/mL. Expresado como cantidad de proteína, se pudo detectar hasta 0.150 μ g (1 μ g/mL) de VP6, el siguiente punto de análisis fue de 15ng (100 ng/mL), el cual dio negativo. Los 10.2 ng (68 ng/mL) de proteína mínima que reporta el fabricante se encuentran en el mismo orden de magnitud que nuestro valor negativo y sabiendo que las cargas virales presentes en individuos con rotavirus son dos ordenes de magnitud superiores, podemos concluir que la prueba es adecuada para la detección de rotavirus tipo A.

VI.1.2 Resultado de las muestras analizadas

Se recibieron en total 128 muestras de 10 regiones del país en el periodo comprendido entre noviembre de 2005 y junio de 2006. Se muestrearon 26 ranchos con episodios de diarrea en los neonatos (hasta 45 días de nacidos), también se muestrearon animales que estuvieron enfermos y ya no presentaban síntomas y animales sanos como controles negativos para las pruebas de detección. En total se encontraron 12 muestras positivas confirmadas, correspondientes al 9.4% de la población muestreada. Cabe destacar que se encontraron zonas con focos de infección superiores al 30% de los animales (Comarca Lagunera, Chihuahua, Tijuana). Algunos de los resultados negativos por

zonas se debieron básicamente a muestreos de animales mayores (entre 45 y 90 días de nacido) cuyos síntomas de enfermedad diarreica bovina habían cesado.

Tabla 6.1 Resultado del muestreo para detección de rotavirus grupo A

Procedencia	Ranchos	Muestras totales	Muestras líquidas	Muestras positivas	% del total	% de las líquidas
Altos de Jalisco	NR	17	10	1	5.9	10
Aguascalientes	4	8	4	1	12.5	25
Querétaro	3	21	12	0	0	0
Tizayuca	2	12	11	4	33.3	36.4
C. Lagunera	4	14	9	1	7.1	11.1
Chihuahua	2	9	7	3	33.3	42.9
Tabasco [†]	3	12	4	0	0	0
Veracruz [†]	3	15	6	0	0	0
Chiapas [†]	4	18	12	0	0	0
Tijuana	1	2	2	2	100	100
TOTAL	26	128	77	12	9.4	15.6

[†] Animales sin síntomas en la fecha del muestreo pero que tuvieron episodios diarreicos previos y cuyas edades promedio oscilaban entre 28 y 90 días de nacidos

NR: Datos no reportados

Los animales que resultaron positivos para rotavirus se encuentran en un rango de edad entre 5 y 42 días de nacidos, correspondiente a los datos reportados para la diarrea neonatal bovina (Holland, 1990, Odeón, 2001). Se encontraron 7 animales hembras, 4 machos positivos y uno cuyo sexo no fue reportado. Las muestras provenían de 7 de las 10 regiones del país establecidas para el muestreo. En la tabla 6.2 se resumen los resultados de las muestras positivas obtenidas, dando su número de codificación interno con el cual serán identificadas a lo largo del documento.

Debido a la falta de información por parte del veterinario sobre los cuadros clínicos de los animales, se realizó un análisis visual sobre la consistencia de las heces

fecales a fin de establecer los animales que presentaban cuadros clínicos asociados a enfermedad diarreica bovina. Estos datos fueron consignados en la columna “Muestras líquidas” y fueron estos becerros fueron considerados como animales con síntomas de enfermedad.

Tabla 6.2 Información detallada de las muestras positivas para rotavirus grupo A

Muestra No.	Edad (d)	Lugar	Rancho	Sexo
14 ^(NR)	NR	Altos de Jalisco	NR	NR
19 ^(NR)	8	Aguascalientes	Las Isabelas	Macho
47 ^(NR)	16	Tizayuca	124	Hembra
49 ^(NR)	14	Tizayuca	124	Hembra
50 ^(NR)	11	Tizayuca	124	Hembra
58 ^(NR)	14	Tizayuca	122	Hembra
61 ^(NR)	NR	C. Lagunera	León Guzmán	Hembra
75 [†]	14	Chihuahua	Los Arados	Macho
76 [†]	42	Chihuahua	Los Arados	Macho
80 [*]	8	Chihuahua	El chamizal	Macho
127 [†]	5	Tijuana	El cachanilla	Hembra
128 [†]	7	Tijuana	El cachanilla	Hembra

^{NR} Datos no reportados, ^(*) Madres no vacunadas, ^(†) **Madres vacunadas**

VI.2 Identificación de genotipos G

A las muestras positivas para rotavirus A se les realizó el proceso de genotipificación que se describe con detalle en el numeral V.5.2.1. Las condiciones de las reacciones de RT-PCR y multiplex PCR se siguieron tal y como están descritas en las tablas 5.1 y 5.2. Los productos de amplificación por RT-PCR corresponden a fragmentos de 1011 pb del gen de VP7, al analizarse en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. La figura 6.2 muestra los productos de amplificación de algunas de las muestras de campo positivas, control negativo y muestra de la vacuna Scourguard[®]3 (K/C) (Pfizer).

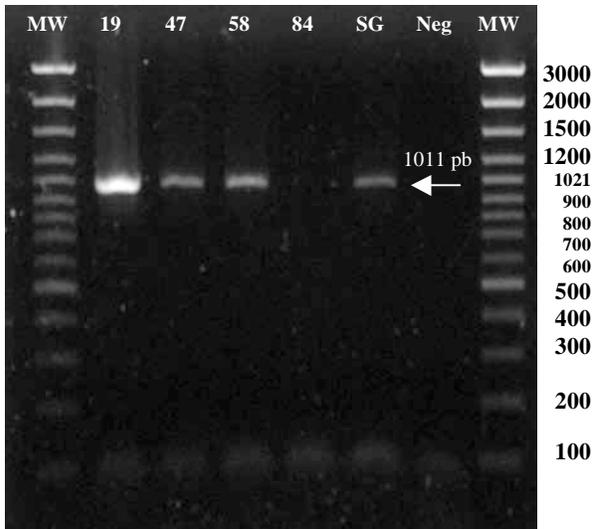


Figura 6.2 Productos del RT-PCR para el segmento 9 de rotavirus, usando los oligos Bov9Com5 y Bov9Com3. Las muestras positivas deben dar un fragmento de 1011pb. Las muestras 19, 47 y 58 son muestras de campo que dieron positivas para rotavirus A, la 84 es una muestra de campo negativa, SG es la vacuna de rotavirus atenuada disponible en el mercado (Scourguard®) y Neg es el control negativo del proceso de PCR, en el cual se colocan todos los reactivos del PCR pero sin templado. Se utilizó como marcador de peso molecular (MW) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas Inc.) Gel de Agarosa al 1%, 30 min a 100 V, teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV.

Los productos de genotipificación G amplifican fragmentos de 224, 450 y 665 pb, que corresponden a los genotipos G8, G6 y G10 respectivamente. La figura 6.3 muestra algunos de los productos de amplificación del *multiplex* PCR. Se observan dos muestras con genotipo G6 (49 y 50) y 3 muestras con genotipos G10 (19, 58 y 61). El proceso se realizó para las 12 muestras positivas encontradas, para la vacuna Scourguard (G6, P[1]) y para la cepa de rotavirus humano 69M (G8, P[10]) cordialmente suministrada por el grupo del Dr. Arias (IBt-UNAM). Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la tabla 6.3.

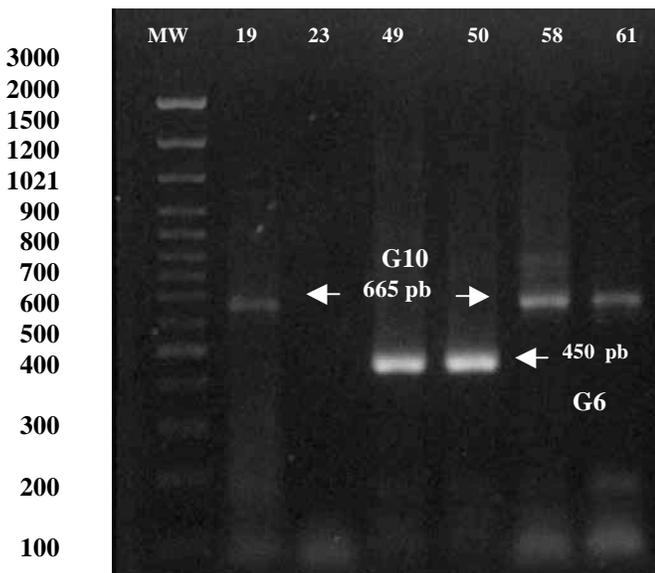


Figura 6.3 Productos del multiplex PCR para genotipos G, usando los oligos Bov9Com5 y el coctel de tipificación G. Las muestras 19, 49, 50, 58 y 61 son muestras de campo que dieron positivas para rotavirus A y amplificaron previamente por RT-PCR el fragmento de 1011 pb, la 23 es una muestra de campo negativa. (MW) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas Inc.) Gel de Agarosa al 1%, 30 min a 100 V, teñido con bromuro de etidio 0.5 mg/mL y visualizado con luz UV.

VI.3 Identificación de genotipos P

A las muestras positivas para rotavirus A se les realizó el proceso de genotipificación que se describe con detalle en el numeral V.5.2.2. Las condiciones de las reacciones de RT-PCR y multiplex PCR se siguieron tal y como están descritas en las tablas 5.1 y 5.2 . Se evaluaron las 3 estrategias propuestas, las muestras que no se pudieron amplificar con la estrategia CON fueron amplificadas satisfactoriamente con la estrategia BOV o con la estrategia HYBR. En la figura 6.4 se muestran los productos del RT-PCR. La estrategia CON amplifica 876 pb, la BOV amplifica 863 pb y la HYBR amplifica 1919 pb.

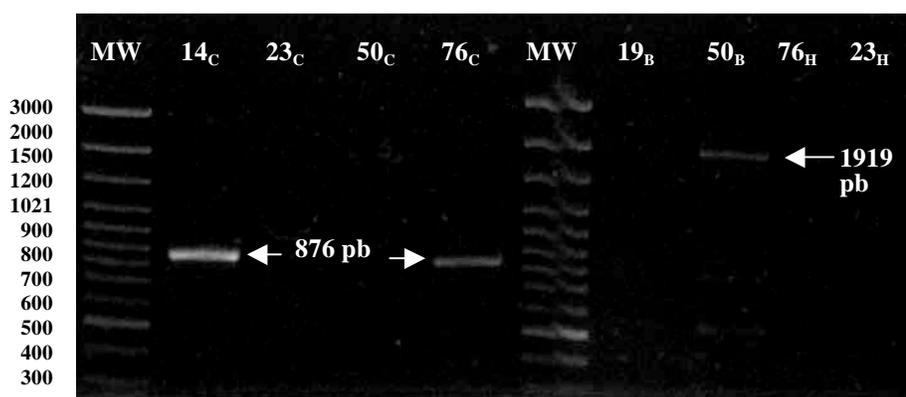


Figura 6.4 Productos del RT-PCR para el segmento 4 de rotavirus. Las muestras 14, 19, 50 y 76 son muestras de campo que dieron positivas para rotavirus A, la muestra 23 es negativa. Los subíndices C usaron la estrategia CON, los B la estrategia BOV y los H la HYBR (MW) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas Inc.) Gel de Agarosa al 1%, 30 min a 100 V, teñido con bromuro de etidio 0.5 mg/mL y visualizados con luz UV.

Para la genotipificación P, los mejores resultados se obtuvieron con la estrategia CON. Las muestras 47 y la de la vacuna Scourguard® (SG) no se pudieron amplificar de forma clara con la estrategia CON pero si con la estrategia BOV. En la figura 6.5 se muestran los productos de la genotipificación usando la estrategia CON (una banda de 314 pb corresponde al genotipo P[11] y una banda de 555 pb para P[5]) . El total de los resultados obtenidos se consigna en la tabla 6.3

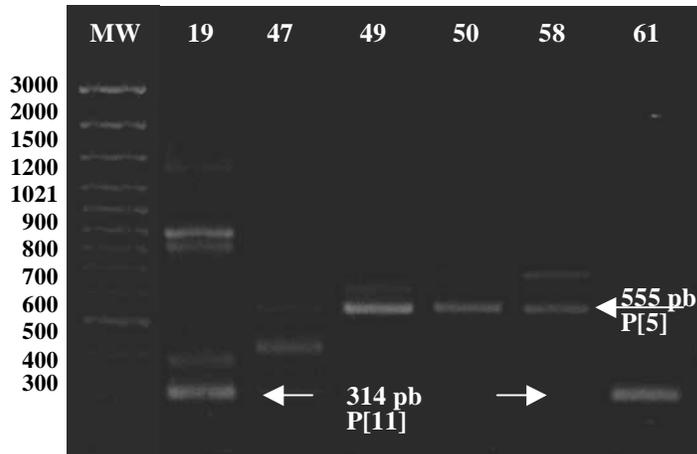


Figura 6.5 Productos del Multiplex PCR para el segmento 4 de rotavirus usando la estrategia CON. Todas las muestras analizadas son positivas confirmadas en la primera ronda de amplificación. (MW) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas Inc.) Gel de Agarosa al 1%, 30 min a 100 V, teñido con bromuro de etidio 0.5 mg/mL y visualizados con luz UV.

Tabla 6.3 Resumen de resultados de genotipificación P y G de las cepas de rotavirus aisladas de heces fecales bovinas y de la vacuna Scourguard

Muestra	Genotipo G	Genotipo P
14 ^(NR)	G10	P11
19 ^(NR)	G10	P11
47 ^(NR)	G6	P5
49 ^(NR)	G10	P5
50 ^(NR)	G6	P5
58 ^(NR)	G6	P5
61 ^(NR)	G10	P11
75 [†]	G10	P11
76 [†]	G10	P11
80 [*]	G10	P11
127 [†]	G10	P11
128 [†]	G10	P11
Scourguard	G6	P1
69M	G8	ND

(*) Madres no vacunadas, (†) Madres vacunadas,
^(NR) Sin reportes de cuadro de vacunación, ND No determinado

Las combinaciones G10, P[11] y G6, P[5] son las predominantes en los muestreos. Se observa mayor proporción para G10, P[11] en las muestras analizadas. Estudios similares realizados en otras partes del mundo (Alfieri *et al.*, 2004, Barreiros *et al.*, 2004, Falcone *et al.*, 1999, Fukai *et al.*, 2002, Gulati *et al.*, 1999, Suzuky *et al.*, 1993, Wani *et al.*, 2004,) reportan la combinación G6,P[5] en mayor proporción que G10, P[11]. Otros estudios realizados en Estados Unidos y Canadá mostraron una similitud con los encontrados en el presente estudio, en los cuales los genotipos G6 y G10 combinados con los genotipos P[5] y P[11] son los más prevalecientes, siendo éstos más del 90% de los rotavirus bovinos aislados. (Chang *et al.*, 1996; Hussein *et al.*, 1995). La información encontrada muestra una relación clara entre genotipos y especie, siendo éstas combinaciones comunes para rotavirus bovino. Un dato importante para analizar es que animales cuyas madres habían sido vacunadas contra genotipos G6,P[1] fueron afectados por rotavirus de genotipos G10,P[11] mostrando así una vez más que la protección entre genotipos es limitada y que la vacuna disponible en el mercado podría no ser la mejor para el país. Así pues, se encontró que la vacuna contra genotipos G6,P[1] no induce inmunidad contra genotipos G10. Otros estudios similares han encontrado resultados concordantes a los encontrados en el presente trabajo y también han reportado que no existe protección de dicha vacuna contra cepas de genotipos G6 que contengan genotipos P diferentes a P[1] (Kimberly *et al.*, 1996). Toda esta información concuerda con los resultados encontrados por el departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA) para rotavirus bovino. Evidencia de esta información fue consignada en el informe enviado a los productores de biológicos veterinarios en septiembre de 2004 y que puede ser consultada en el siguiente *link* de Internet:

www.aphis.usda.gov/vs/cvb/notices/2004/04-16.pdf

Aunque el presente documento no puede ser considerado como un estudio epidemiológico sobre rotavirus bovino debido al limitado número de muestras, esta

es una primera aproximación al conocimiento de los genotipos de rotavirus bovino circulantes en México y las cepas de campo aisladas pueden ser utilizadas para el desarrollo de vacunas recombinantes basadas en PPV.

VI.4 Confirmación de resultados por análisis de secuencias

Se enviaron a secuenciar los fragmentos resultantes del proceso de genotipificación en G y P, realizado a partir de las muestras de campo de heces de bovinos. Se siguió la metodología descrita en el numeral V.7. En el Anexo D se muestran los alineamientos con mayor identidad para las secuencias que fueron consideradas como genotipos G6, G10, P[5], P[11] y P[1] por *multiplex* PCR. Cabe destacar que los resultados obtenidos en este trabajo al analizar la vacuna Scourguard[®] fueron los mismos que los reportados por Barreiros *et al.*, 2004, los que corresponden a la cepa de rotavirus bovino NCDV G6,P[1]. En la tabla 6.4 se resumen los resultados obtenidos mediante el BLAST para las muestras analizadas. En total se realizaron 7 análisis de secuencias: 2 para la vacuna (G6, P[1]) y 5 muestras de campo (19, 47, 49, 50 y 61) que correspondían a los genotipos G10, G6, P[5], G6 y P[11] respectivamente. Se enviaron a secuenciar los fragmentos de los genes que codifican para VP4 y VP7, los cuales incluyen sectores hipervariables de cada uno de los genes (segmentos 4 y 9) y que permiten la identificación de los diferentes genotipos. Los nucleótidos no reconocidos (N) no fueron tomados en cuenta para calcular el porcentaje de identidad de las muestras. Todas las cepas tabuladas corresponden a los genotipos que fueron identificados por *multiplex* PCR, confirmando la robustez de la técnica aplicada.

Tabla 6.4 Resultado de la comparación de identidad entre las muestras secuenciadas y cepas del GenBank mediante BLAST

Muestra No.	Tamaño del fragmento (pb)	Genotipo encontrado	CEPA IDENTIFICADAS	Porcentaje de identidad
19	665	G10	B223 (G10) 2292B (G10) KK3 (G10)	95.0% 93.7% 93.7%
47	500	G6	IND (G6) JB1(G6) NCDV(G6) UK(G6)	93.4% 93.0% 90.0% 91.0%
49	555	P[5]	678 (P[5]) V1005 (P[5]) 61A (P[5]) P343 (P[5])	88.0% 90.0% 89.0% 87.0%
50	450	G6	IND (G6) CIT39A/02(G6) UK (G6) 83/16F (G6) NCDV (G6)	94.0% 95.0% 94.0% 94.0% 92.0%
61	314	P[11]	Aislado [†] (P[11]) B223 (P[11]) A44 (P[11])	92.3% 88.5% 88.5%
Scourguard	460	P[1]	RF (P[1]) NCDV (P[1]) C486 (P[1]) SA11 (P[1])	98.7% 98.0% 98.0% 94.0%
Scourguard	500	G6	CHLY (G6) RF (G6) NCDV (G6) UK (G6)	97.3% 97.3% 93.8% 90.4%

[†] Cepa no clasificada

VI.5 Análisis de secuencias de los genotipos de rotavirus

VI.5.1 Segmento 9 del genoma de rotavirus

Se realizó el análisis de secuencias teniendo en cuenta los datos reportados en la *GenBank* para 15 cepas que representan los genotipos G conocidos hasta la fecha, además se incluyeron las secuencias de los genes aislados de campo (Muestras 19 y 50). En la tabla 6.5 se muestran los números de acceso al *GenBank* y el origen de las cepas analizadas. La elección de cada cepa

correspondió a la búsqueda de cepas de diferentes orígenes y que han sido utilizadas comúnmente en estudios de genotipificación alrededor del mundo.

Tabla 6.5 Cepas de rotavirus representativas de los 15 genotipos G

Genotipo G	Cepa	Origen	No. Acceso GenBank
1	WA	Humano	K02033
2	HU5	Humano	A01028
3	SA11	Simio	K02028
4	ST3	Humano	X13603
5	OSU	Porcino	X04613
6	NCDV	Bovino	M12394
7	Ch2	Aviar	X56784
8	B37	Humano	J04334
9	116E	Humano	L14072
10	B223	Bovino	X57852
11	YM	Porcino	M23194
12	L26	Humano	M58290
13	L338	Equino	D13549
14	FI23	Equino	M61876
15	Hg18	Bovino	AF237666

Con esta información, se realizaron alineamientos de las secuencias para observar homologías entre genotipos, se verificaron las secuencias consenso de los oligonucleótidos reportados en literatura (Gouvea *et al.*, 1994, Isegawa *et al.*, 1993) y que fueron utilizados en este trabajo. Finalmente, se corroboró la homología de secuencias con las cepas aisladas de campo y se construyó un árbol filogenético basado en el porcentaje de identidad entre las cepas analizadas para corroborar los resultados obtenidos mediante *multiplex* PCR.

Tabla 6.6 Porcentajes de homología entre secuencias nucleotídicas de 15 cepas de rotavirus representativas de los diferentes genotipos G

Genotipo G															
Cepa															
1	WA(hu)	WA	2												
2	HU5(hu)	74	HU5	3											
3	SA11(si)	76	74	SA11	4										
4	ST3(hu)	77	71	75	ST3	5									
5	OSU(po)	76	73	76	77	OSU	6								
6	NCDV(bo)	74	74	76	74	75	NCDV	7							
7	Ch2(Av)	66	64	64	65	66	54	Ch2	8						
8	B37(hu)	72	73	75	72	74	74	62	B37	9					
9	116E(hu)	76	74	78	75	78	76	64	75	116E	10				
10	B223(bo)	75	72	77	73	74	75	66	75	76	B223	11			
11	YM(po)	74	75	77	75	82	74	63	75	78	75	YM	12		
12	L26(hu)	75	73	77	74	76	75	64	73	76	74	74	L26	13	
13	L338(eq)	74	72	77	73	74	75	67	73	75	74	74	75	L338	14
14	F123(eq)	75	74	80	74	76	75	66	74	78	74	77	75	76	F123
15	Hg18(bo)	73	72	75	72	74	74	65	73	74	73	75	72	72	73
6	Muestra 50	73	73	75	73	74	91	55	73	73	75	73	73	71	70
10	Muestra 19	73	72	75	72	73	74	63	73	74	95	73	72	70	70

La tabla 6.6 resume los resultados obtenidos al realizar el análisis de homología entre secuencias nucleotídicas, utilizando el *software* CLUSTAL W (Higgins *et al.*, 1994). Las secuencias completas analizadas mediante el editor de secuencias en lenguaje Java, Jalview (Clamp *et al.*, 2004) se muestran en el anexo B. Utilizando el programa Treeview (Page, 1996) se realizó un árbol filogenético basado en el porcentaje de identidad. El resultado de dicho análisis se muestra en la figura 6.6. La barra de calibración horizontal indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En la tabla 6.6 se observa que las homologías nucleotídicas entre diferentes tipos de genotipos G son inferiores al 82% lo cual es correspondiente con lo reportado en la literatura (Estes, 1996, Gentsch *et al.*, 1996, Sereno *et al.*, 1994, Cao *et al.*, 1999). Para las cepas de campo, se observaron homologías nucleotídicas del 91% (Muestra 50) para genotipo G6 y 95% (Muestra 19) para genotipo G10, lo cual concuerda con los análisis de genotipificación realizados.

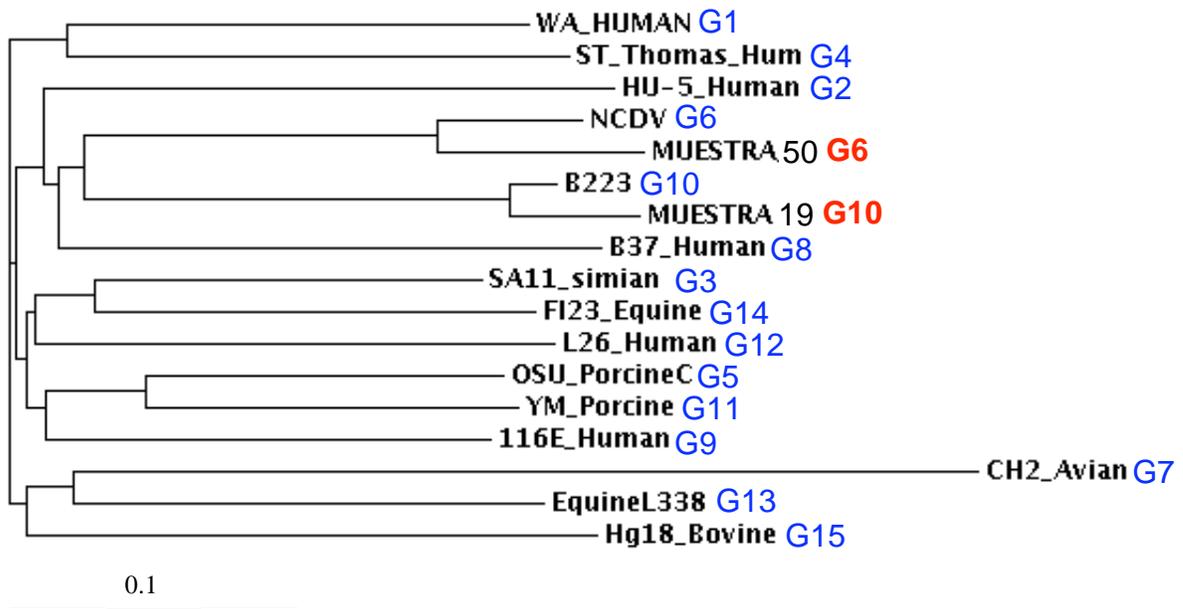


Figura 6.6 Árbol filogenético basado en el porcentaje de identidad de secuencias nucleotídicas del segmento 9 de rotavirus para cepas representativas de los 15 genotipos G. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio

VI.5.2 Segmento 4 del genoma de rotavirus

De la misma forma que para los genotipos G, se realizó un análisis similar para 26 diferentes cepas que representan los 26 genotipos de VP4 reportados hasta la fecha. Lamentablemente, las secuencias de las muestras de campo representaban solo un pequeño tramo del gen, lo que impidió analizarlas. En la tabla 6.7 se listan las cepas analizadas, su código de acceso en el *GenBank* y su especie de origen.

Se alinearon las secuencias para observar homologías en los diferentes genotipos P de rotavirus (Tabla 6.8), se corroboraron los oligonucleótidos elegidos y se construyó el árbol filogenético de los diferentes genotipos, basado en el porcentaje de identidad entre las cepas analizadas (Figura 6.7). Las secuencias completas analizadas mediante Jalview para el segmento 4 de los 26 genotipos P conocidos se muestran en el anexo C.

Tabla 6.7 Cepas de rotavirus representativas de los 26 genotipos P

Genotipo P	Cepa	Origen	No. Acceso GenBank
1	A5	Bovino	D13395
2	SA11	Simio	X14204
3	HCR3	Humano	L19712
4	RV5	Humano	M32559
5	UK	Bovino	M22306
6	Gottfried	Porcino	M33516
7	OSU	Porcino	X13190
8	Wa	Humano	L34161
9	AU1	Humano	D10970
10	69M	Humano	M60600
11	116E	Humano	L07934
12	H2	Equino	L04638
13	MDR13	Porcino	L07886
14	Mc35	Humano	D14032
15	LP14	Ovino	L11599
16	Eb	Murino	L18992
17	993/83	Bovino	D16352
18	L338	Equino	D13399
19	4F	Porcino	L10359
20	EHP	Murino	U08424
21	Hg18	Bovino	AF237665
22	160/01	Conejo	AF526374
23	A34	Porcino	AY174094
24	TUCH	Simio	AY596189
25	Dhaka6	Humano	AY773004
26	134/04-15	Porcino	DQ061053

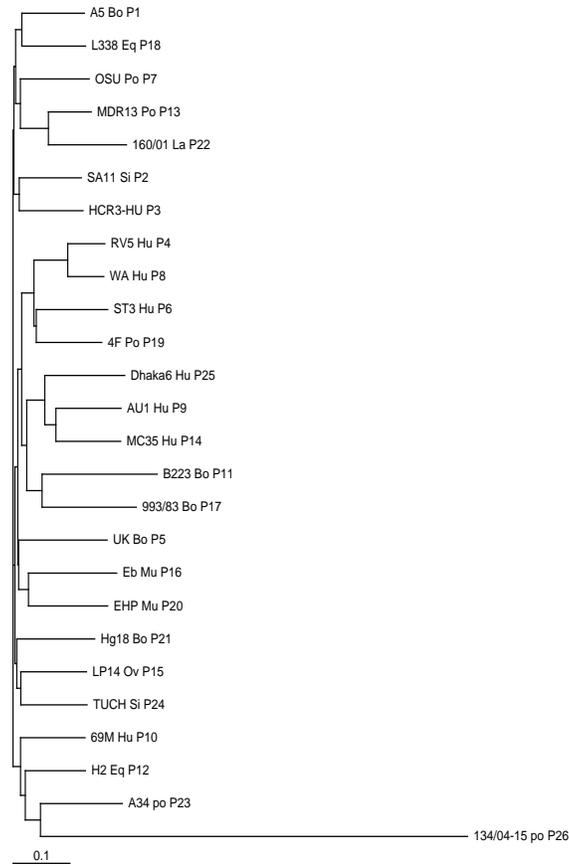


Figura 6.7 Árbol filogenético basado en el porcentaje de identidad de secuencias nucleotídicas para cepas representativas de los 26 genotipos P de rotavirus.

Los resultados obtenidos sobre las homologías entre genotipos P de rotavirus muestran una alta variabilidad en las secuencias nucleotídicas, encontrándose valores desde 54% hasta 79% de identidad entre las cepas analizadas. Según la literatura (Estes, 1996, Gentsch *et al.*, 1996, Sereno *et al.*, 1994, Cao *et al.*, 1999), secuencias nucleotídicas con homologías superiores al 85% pertenecen a un mismo genotipo.

VI.6 Construcción de baculovirus recombinantes de VP7

VI.6.1 Construcción en pCR[®]8TOPO

Se escogieron dos muestras de campo representativas de los dos genotipos G encontrados. Se usaron la muestra 19 correspondiente al genotipo G10 y la

muestra 50 correspondiente al genotipo G6. Se aisló el dsRNA como se indica en el numeral V.4.2 y se amplificaron 1011 pb del gen de VP7, utilizando el protocolo establecido previamente en el numeral V.5.1.

La reacción de clonación de vectores TOPO[®] se realizó siguiendo el protocolo especificado en el numeral V.8.2 y la transformación de células de *E. coli* se llevó a cabo como se explica en el numeral V.8.3. A continuación se muestra el análisis por patrón de restricción de algunas de las clonas obtenidas:

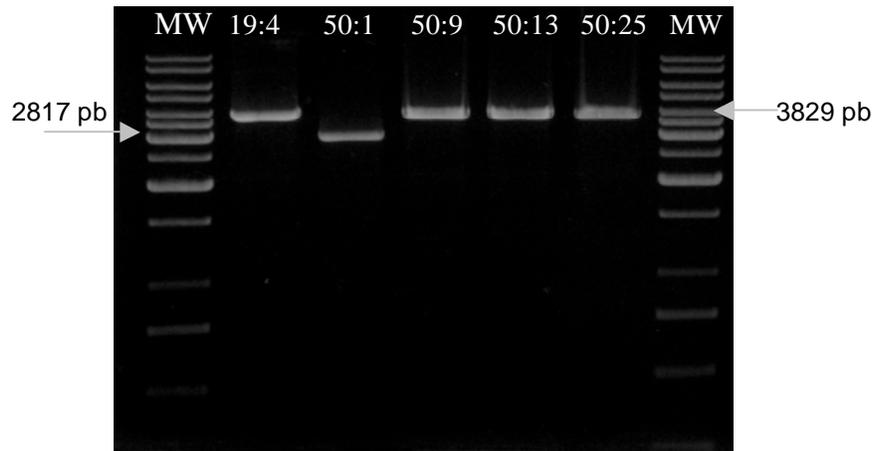


Figura 6.8 Digestión de plásmido pCR[®]8 recombinante para los genotipos G6 (50) y G10 (19) con XhoI. Esta enzima presenta un solo sitio de corte en el vector, los genes aislados de G6 y G10 no tienen sitios para esta enzima. La muestra 50:1 corresponde a la clona #1 de la muestra de campo # 50. Esta clona es una falsa positiva que solo presenta una banda con el tamaño del vector.

Además se realizó un análisis con EcoRI, la cual corta la construcción en sitios que flanquean la zona de inserción del gen, dando como resultado bandas del tamaño del vector (2817 pb) y las dos bandas correspondientes a los productos de digestión dentro del gen (figura 6.9). En el caso de G10, al realizar el análisis de secuencias se encontró que el gen aislado tiene un sitio EcoRI a 961 pb del inicio del gen y para G6 se encontró un sitio EcoRI a 214 pb del inicio del gen.

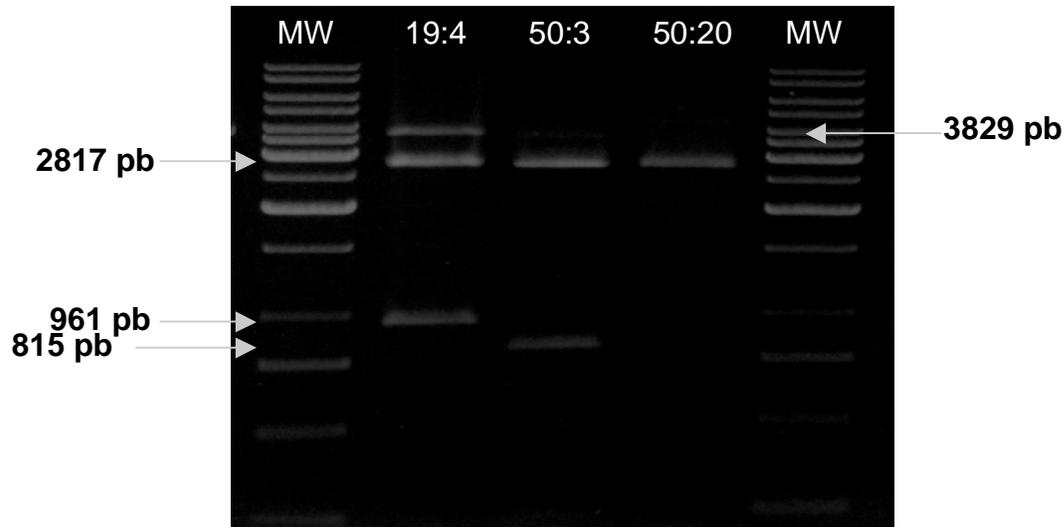


Figura 6.9 Digestión de plásmido pCR[®]8 recombinante para los genotipos G6 (50) y G10 (19) con EcoRI. Esta enzima presenta un corte en el vector, y un corte en cada uno de los genes aislados de G6 y G10. La muestra 50:20 corresponde a una falsa positiva que solo presenta una banda con el tamaño del vector.

Se verificó que las clonas 19:4 y 50:3 tenían la construcción esperada, pero estos ensayos con enzimas de restricción no dicen nada sobre la orientación del gen clonado, por lo que hubo necesidad de montar un PCR utilizando el oligo Bov9Com5 (sitio de unión dentro del gen) y el oligo GW2 que hibrida a 75 pb del sitio de clonación. En caso de estar el gen en la orientación correcta, se espera obtener un producto de 1086 pb al utilizar esta combinación de oligos. En la figura 6.10 se muestra el gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para 6 clonas diferentes. Todas las clonas analizadas presentan la orientación correcta del gen (orientación 5'→3' luego del sitio *attL1*). Se escogieron las clonas 19:4 y 50:3 para verificar la secuencia del gen clonado, siguiendo la metodología explicada previamente en el numeral V.7. Este proceso corroboró la presencia de los genotipos G6 y G10 aislados y clonados en el vector PCR[®]8.

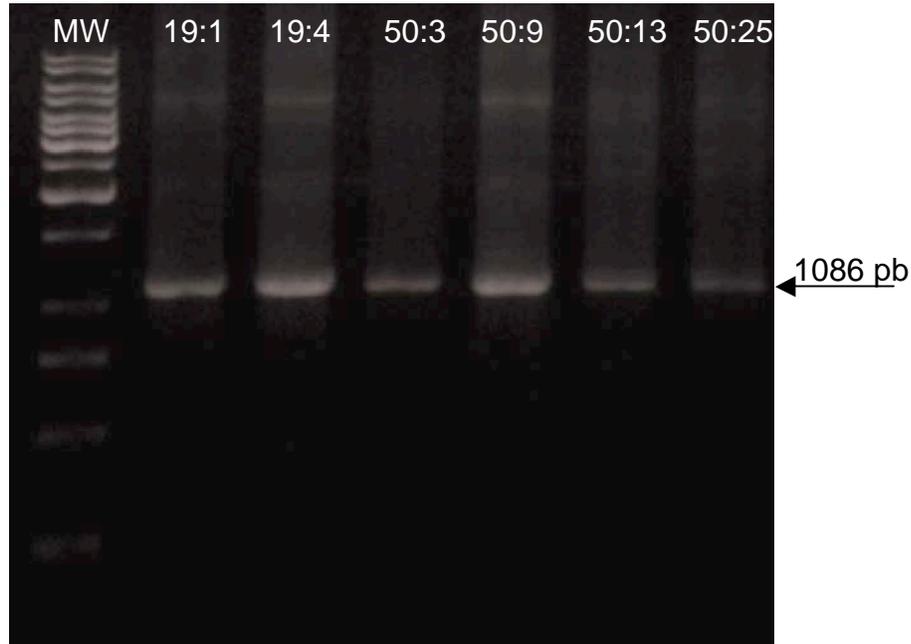


Figura 6.10 Orientación del gen. Uso de oligo Bov9com5 (extremo 5' del gen) y GW2 (extremo 3' en la secuencia del plásmido).

VI.6.2 Clonación en el vector pDEST8®

La construcción realizada en pCR®8TOPO fue utilizada para realizar la reacción de recombinación con el vector pDEST®8 tal y como se describe en el numeral V.8.5. De las colonias obtenidas al transformar células de *E. coli* se extrajeron los plásmidos recombinantes. A dichos plásmidos se les hizo un análisis con EcoRI por patrones de restricción tal y como se describe en el numeral V.8.7.1. En la figura 6.11 se muestran los resultados obtenidos al hacer el patrón de restricción de 10 clonas (5 para G6 y 5 para G10). Se montó como control negativo el vector pDEST®8, el cual no presenta sitios EcoRI. Las clonas en las que no hubo recombinación presentan un tamaño de 6526 pb mientras que las que tienen el gen de VP7 presentarán un tamaño de 5768 pb, ya que el proceso de recombinación escinde alrededor de 3100 pb del vector destino.



Figura 6.11 Digestión de plásmido pDEST[®]8 recombinante para los genotipos G6 (50) y G10 (19) con EcoRI. El vector pDEST[®]8 no presenta sitios de corte para esta enzima, pero ésta corta en 3 sitios del fragmento que recombina con pCR[®]8: un sitio de corte en cada uno de los genes aislados de G6 y G10 y dos sitios que flanquean el gen.

Después del análisis por patrón de restricción se escogieron las clonas 19:4:3 y 50:3:5 para realizar la transformación de las células de *E. coli* DH10[®]Bac, las cuales tienen el bácido que se va a recombinar con pDEST[®]8.

VI.6.3 Clonación en células de *E. coli* DH10[®]Bac

Se realizó la transformación de células DH10[®]Bac como se explica en el numeral V.9.1. Las cajas de Petri se dejaron crecer dos días y se verificaron los fenotipos de las colonias, escogiendo 20 colonias blancas, las cuales fueron re-estriadas. Las clonas con fenotipos blancos únicos fueron crecidas en medio líquido, tal y como se describe en el numeral V.9.2. El bácido recombinante se usó como templado en una reacción de PCR que verifica la presencia del gen de interés en la construcción (ver numeral V.9.3).

El gel de agarosa de los productos de PCR analizados se muestra a continuación:

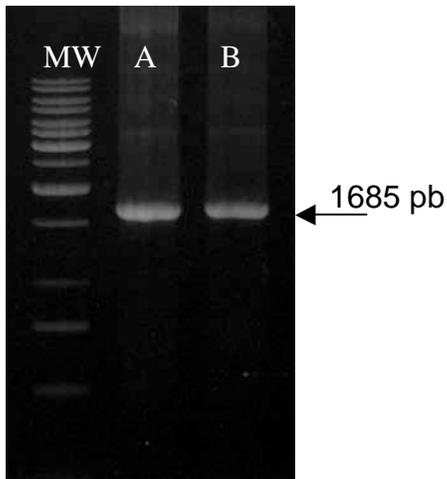


Figura 6.12 Producto de reacción de PCR para los bácmidos recombinantes. El producto esperado al utilizar los Oligos Bov9Com5 y M13 reverse corresponde a un fragmento de 1685 pb. El carril A corresponde a la clona 19:4:3:7 (genotipo G10) y el carril B corresponde a la clona 50:3:5:1 (genotipo G6)

Los bácmidos aislados 19:4:3:7 (G10) y 50:3:5:1 (G6) fueron utilizados para el proceso de transfección en células de insecto.

VI.6.4 Transfección en células de insecto

Los bácmidos obtenidos en la etapa anterior fueron utilizados para la transfección en células Sf9 sembradas en placas de 6 pozos, siguiendo el protocolo explicado en el numeral V.9.4. Se siguieron durante 96 horas los signos de infección de cada cultivo (aumento en el diámetro celular y nuclear, interrupción del crecimiento celular, apariencia granular, despegado y lisis celular). Al final de este tiempo, las células fueron cosechadas y se separaron *pellet* y sobrenadante para su posterior uso.

El sobrenadante contiene los nuevos baculovirus recombinantes y fue utilizado para amplificar el *stock* viral y para obtener proteínas recombinantes de VP7 de los genotipos G6 y G10.

VI.6.5 Expresión de GP64

Para verificar la presencia de baculovirus en los cultivos infectados, se montó un ensayo de Western Blot que identifica la proteína transmembranal de baculovirus GP64. Esta proteína se encuentra preferentemente en el *pellet* del cultivo (O'Reilly *et al.*, 1992). Para ello, se tomaron 5 μ L de *pellet* celular al final de las 96 h de infección y se montaron geles de acrilamida al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y se realizó Western Blot de las muestras, usando para ello un anticuerpo monoclonal ratón-antiGP64 (FastPlax[®]) y un anticuerpo secundario antiratón peroxidasa.

Los resultados del Western Blot se muestran a continuación:

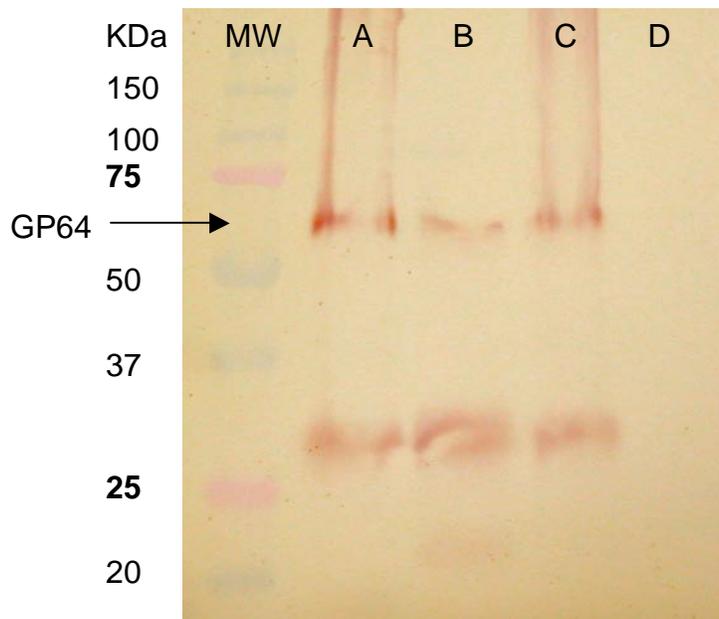


Figura 6.13 Western Blot para GP64 de baculovirus. **Carriles: MW)** Marcador de peso molecular Dual Color BioRad[®] **A)** Cultivo infectado con BacVP7-G6 **B)** Control positivo, células infectadas con BacVP7 de SA11 **C)** Cultivo infectado con BacVP7-G10 **D)** Control negativo, células de Sf9 sin infectar.

En este ensayo se encontró que la proteína de GP64 se hallaba en los cultivos infectados con BacVP7(G10), BacVP7(G6) y BacVP7 de SA11, corroborando la

presencia de los baculovirus construidos. En la membrana también se puede observar una banda alrededor de los 32 kDa, que corresponde al producto de proteólisis de la proteína GP64. Para identificar que las proteínas de VP7 se estuvieran expresando en los cultivos infectados con los baculovirus recombinantes, se realizó el siguiente ensayo:

VI.6.6 Expresión de proteínas recombinantes

Los sobrenadantes de la infección de células Sf9 fueron utilizados para verificar la expresión de las proteínas de VP7 de los genotipos G6 y G10. Se tomaron 10 μ L de cada infección y se corrieron en geles de acrilamida al 10%. Posteriormente, las proteínas de estos geles fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa para realizar ensayos de Western Blot, tal y como se describe en el numeral V.9.5. A continuación se observan los resultados obtenidos:

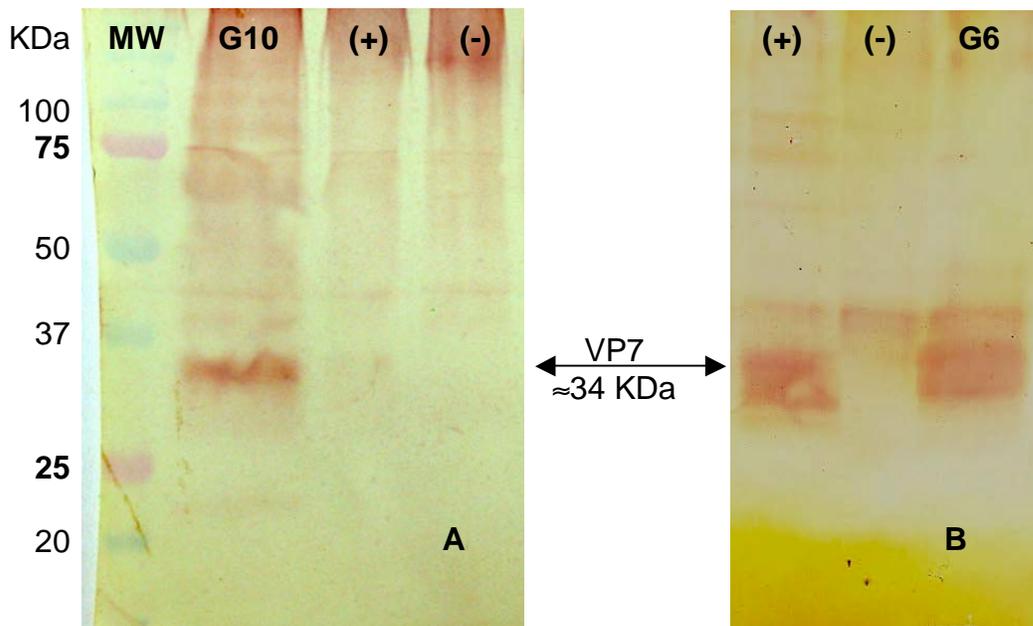


Figura 6.14 Western Blot para VP7 de rotavirus. **A)** Verificación de la presencia de VP7 en los cultivos infectados con el baculovirus BacVP7(G10), **MW:** Marcador de peso molecular Dual Color BioRad® **B)** Presencia de VP7 en los cultivos infectados con baculovirus BacVP7(G6). Se utilizó como control positivo cultivos infectados con BacVP7 de SA11, como control negativo se utilizaron sobrenadantes de cultivos de Sf9 sin infectar.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Western Blot podemos asegurar que los baculovirus recombinantes construidos expresan las proteínas de VP7 de los genotipos G6 y G10, al observar la presencia de la banda de ≈ 34 kDa. La cual se encuentra dentro del rango reportado para VP7 de diferentes cepas de rotavirus (Estes, 1996).

VI.7 Construcción de baculovirus recombinantes de VP4

El proceso de clonación de genes de VP4 no pudo realizarse debido a dificultades encontradas para expresar el gen completo en reacciones de PCR convencionales. Se realizaron reacciones de PCR utilizando los oligos diseñados (ver tabla 5.5) sin obtener resultados satisfactorios. Las condiciones de reacción fueron modificadas así como las cantidades de templado (RT) y de ión Mg^{+2} . Ninguna de las condiciones propuestas tuvo resultado positivo. Durante el proceso de genotipificación se realizó amplificación de un fragmento de 1919 pb, pero debido a la baja homología del extremo 3' entre diferentes genotipos P, la amplificación del gen de 2362 pb no fue posible ya que no se conoce la secuencia completa de los genotipos aislados de las muestras de campo.

Se cambiaron los oligos utilizados, usando para ello los oligos YM cordialmente suministrados por el grupo de la Dra. S. López (IBt-UNAM), sin obtenerse resultados positivos. De igual forma, se realizaron ensayos con el termociclador de gradientes, para evaluar las temperaturas de alineamiento de la reacción de PCR. Se realizaron barridos desde 45°C hasta 65°C para reacciones con los dos pares de oligos, ninguna de las reacciones realizadas tuvo un resultado positivo.

VI.7.1 Purificación de partículas virales

Se realizó el proceso de purificación de partículas virales a partir de muestras de campo. Para ello se escogieron las muestras 49 (genotipo P[5]) y 75 (genotipo P[11]). Se siguió el protocolo descrito en el numeral V.10.1. En la figura 6.15 se

observa un tubo del gradiente de CsCl para la muestra 75 (P[11]), en la cual se observa una banda superior correspondiente a partículas virales completas y una banda inferior correspondiente a las DLP's.

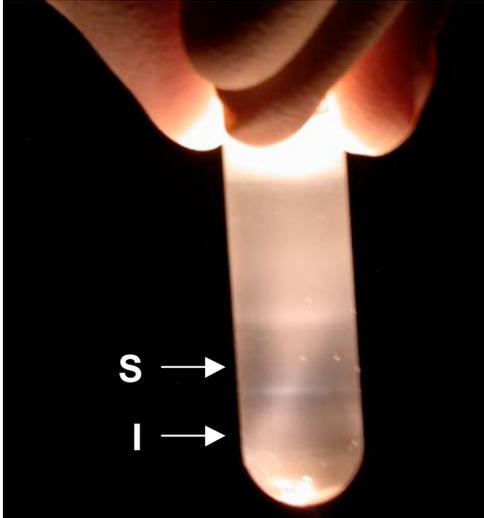


Figura 6.15. Gradiente de cloruro de cesio para purificación de partículas virales. La banda superior (S) está formada por partículas virales completas y la banda inferior (I) contiene DLP.

Para verificar la composición de cada una de las bandas aisladas mediante el gradiente de CsCl se realizó un Western Blot, tal y como se describe en el numeral V.9.5. La figura 6.16 muestra los resultados obtenidos, observándose principalmente las proteínas VP2 y VP6 en ambos carriles, pero en el carril que contiene la banda superior se observan algunas otras proteínas de rotavirus, con lo que se puede pensar que este carril corresponde a partículas virales completas mientras que el carril que muestra la banda inferior tiene preferentemente DLP's.

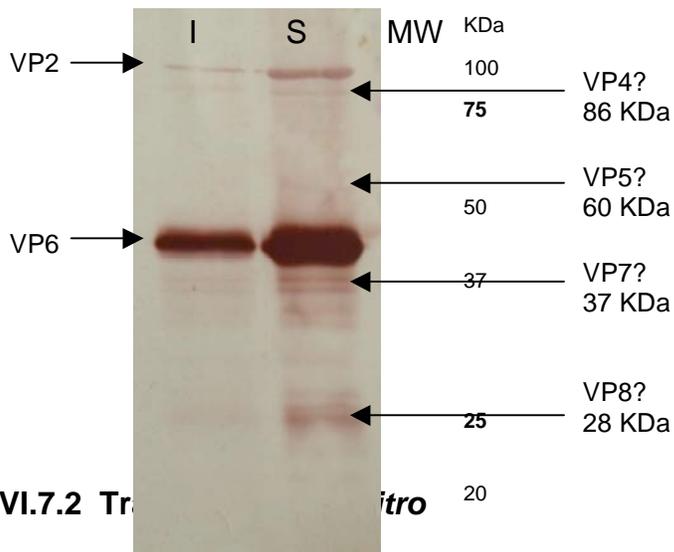


Figura 6.16. Western Blot de las bandas aisladas mediante gradiente de CsCl. La banda superior (S) está formada preferentemente por partículas virales completas y la banda inferior (I) contiene DLP. MW: Marcador de peso molecular DualColor® BioRad.

VI.7.2 Tr... itro

La reacción de transcripción *in vitro* se realizó tal y como se indica en el numeral V.10.2. El producto de transcripción fue purificado y resuspendido en agua libre de nucleasas.

VI.7.3 Reacción de RT PCR a partir de mRNA

El mRNA obtenido en la transcripción *in vitro* fue utilizado como templado tal y como se indica en el numeral V.10.3. No se obtuvieron amplicones en este proceso. Se realizaron modificaciones a la reacción de RT PCR sin obtenerse ningún resultado positivo.

Las dificultades presentadas en el proceso pueden radicar en el desconocimiento de las secuencias del extremo 3' de los genes de campo, ya que corresponden a sectores variables entre genotipos. Se propone utilizar la metodología 3' RACE para amplificar los genes completos de VP4 de las muestras de campo. Estos ensayos y los procesos de clonación de dichos genes serán probados fuera del marco de la tesis de maestría y serán utilizado para los estudios posteriores del grupo de investigación.

Capítulo VII

Conclusiones

La incidencia de rotavirus en México genera importantes pérdidas económicas al sector ganadero. En la búsqueda por mejorar las condiciones de sanidad animal, se propuso el presente proyecto en el que se establecieron metodologías para la identificación de los genotipos de rotavirus bovino en el territorio mexicano.

El desarrollo del presente trabajo permitió establecer la incidencia de la enfermedad en el 70% de los estados objeto de este estudio, en el 30.8% de los ranchos muestreados. Se encontró que cerca del 15.6% de la población animal analizada con síntomas de enfermedad diarreica neonatal, presentaban incidencia de rotavirus tipo A como agente etiológico. Se encontró que la incidencia de rotavirus también se presentó en animales cuyas madres habían sido vacunadas, mostrando que los procesos de vacunación no protegían eficientemente al ganado bovino. Se encontró así que animales cuyas madres habían sido vacunadas contra genotipos G6, P[1] presentaban enfermedad diarreica asociada a rotavirus. Este porcentaje de animales enfermos correspondió al 36.4% de la población positiva para rotavirus determinada en el presente estudio.

Al realizar el estudio de genotipificación se encontraron las siguientes combinaciones: **G10, P[11] (67%)**; **G6, P[5] (25%)**; **G10, P[5] (8%)**. La información encontrada muestra una relación clara entre genotipos y especie, siendo éstas combinaciones comunes para rotavirus bovino. Los animales cuyas madres habían sido vacunadas y desarrollaron la enfermedad presentaron genotipo **G10, P[11]**, lo cual muestra que la vacuna suministrada no provee

protección heterotípica, tal y como ha sido reportado por el departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA).

Aunque el presente documento no puede ser considerado como un estudio epidemiológico sobre rotavirus bovino debido al limitado número de muestras, esta es una primera aproximación al conocimiento de los genotipos de rotavirus bovino circulantes en México y las cepas de campo aisladas pueden ser utilizadas para el desarrollo de vacunas recombinantes basadas en PPV. Por dicha razón se decidió realizar la construcción de baculovirus recombinantes que expresen las proteínas de VP4 y VP7 de los genotipos hallados en campo, al infectar células de insecto.

Para ello, se aislaron los genes de interés a partir de las muestras de heces fecales de animales enfermos y se clonaron eficientemente en vectores para *E. coli*. Se obtuvieron dos baculovirus BacVP7(G6) y BacVP7(G10) que expresaron las proteínas de VP7 para los genotipos G6 y G10 respectivamente.

Cabe destacar que los primeros ensayos de clonación se realizaron con otros vectores que presentan sitio múltiple de clonación (MCS) y se intentó insertar el gen mediante el uso de enzimas de restricción, sin obtenerse en ningún caso resultados positivos. Los plásmidos usados para VP7 y que no tuvieron ningún resultado fueron pFastBac[®] y pKS usando estrategias de clonación con extremos romos y extremos cohesivos. Los procesos de ligación fueron deficientes y generaron en ocasiones falsos positivos con insertos que no correspondieron a los genes a clonar. Por dicha razón, se utilizaron los vectores TOPO[®] con resultados satisfactorios.

El proceso de clonación de genes de VP4 no pudo realizarse debido a problemas en la amplificación del gen por reacciones de RT PCR convencionales. Se probaron diferentes estrategias de amplificación sin obtener resultados positivos. También se realizaron ensayos de transcripción in vitro en el cual se obtuvo mRNA y se intentó amplificar por medio de RT PCR sin obtenerse amplicones en

este proceso. Se sugiere evaluar la estrategia de amplificación 3' RACE para el segmento 4 de rotavirus. Este proceso será seguido fuera del marco del presente proyecto pero será utilizado para estudios posteriores del grupo de investigación. Los baculovirus de VP7 construidos serán utilizados en próximos estudios para observar las diferencias en procesos de infección, ensamblaje y formación correcta de PPV de rotavirus y serán la base para desarrollar una vacuna recombinante que proteja eficientemente al ganado bovino de la región y disminuir los índices de enfermedad diarreica

Bibliografía

- Alfieri, A. F., Alfieri, A. A., Bacellar, M. A., Gagliardi, J. P., Richtzenhain, L. J. (2004). G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Vet. Microbiol.* 99: 167-173.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- Barreiros M. A., Alfieri A. F., Médici K. C. (2004). G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. *J.Vet. Med.* B51: 104-109.
- Cao, X. R., Akihara, S., Fang, Z. Y., Nakagomi, O., Ushijima, H. (1999). Genetic variation in the VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan. *Microbiol. Immunol.* 43 (2): 171-175.
- Cardoso, D. D. P., Soares C. M. A., Azevedo M. P. S., Leite J. P. G., Munford V., Racz M. L. (2000). Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in Central Brazil. *J. Health. Popul. Nutr.* 18: 39-43.
- Chang K. O., Parwani A. V., Saif L. J. (1996). The characterization of VP7 (G type) and VP4 (P type) genes of bovine group A rotaviruses from field samples using RT-PCR and RFLP analysis. *Arch Virol* 141:1727–1739.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162 (1):156–159.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M. and Barton, G. J. (2004). The Jalview Java Alignment Editor. *Bioinformatics*, 20, 426-427.
- Crawford, S. E., Labbe, M., Cohen, J., Burroughs, M. H., Zhou, Y. J., Estes, M. K. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 68: 5945–5952.
- Estes M. K. (1996). Rotaviruses and their replication. In: *Fields virology* (D.M. Knipe & Howley P.M., eds). Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, pp. 1747-1785.
- Falcone, E., Tarantino, M., Di Trani, L., Cordioli, P., Lavazza, A., Tollis, M. (1999). Determination of Bovine Rotavirus G and P Serotypes in Italy by PCR. *J. Clin. Microb.* 37 (12): 3879-3882.
- Fernández, F. M., Conner, M. E., Hodgins, D. C., Parwani, A.V., Nielsen P.R., Crawford S.E., Estes M. K., Saif L.J. (1998). Passive immunity in newborn calves supplements with recombinant to bovine rotavirus fed colostrum cows immunized SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine* 16: 507-516.
- Fukai K., Maeda Y., Fujimoto K., Itou T., Sakai T. (2002). Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrhoeic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. *Vet. Microbiol.*, 86 (4): 343-349.
- Gentsch, J.R., Woods, P. A., Ramachandran, M., Das, B. K., Leite, J. P., Alfieri, A., Kumar, R., Bhan, M. K., Glass, R. I. (1996). Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.* 174:S30–S36.
- Gouvea, V., Santos, N., Timenetsky, M. C. (1994). VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32 (5): 1333 – 1337.
- Gulati, B., Nakagomi, O., Koshimura, y., Nakagomi, T., Pandey R. (1999). Relative frequencies of G and P types among rotaviruses from indian diarrheic cow and buffalo calves. *J. Clin. Microb.* 37 (6): 2074-2076.
- Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.(1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

- weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Holland, R.E. (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microb. Rev.* 3: 345-375.
- Hussein H. A., Cornaglia, E., Saber, M. S., El-Azhary, Y. (1995). Prevalence of serotypes G6 and 10 group A rotaviruses in dairy calves in Quebec. *C. J. Vet. Res.* 59:235-7.
- Isegawa, Y., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Ishida, S., Uesugi, S., Ueda, S. (1993). Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. *Molec. Cell. Probes.* 7: 277-284.
- Jiskoot, J., Kersten, G. A., Beuvery, E. C. (1997). Vaccines. En: *Pharmaceutical Biotechnology*. Crommelin, D. J. A. and Sindelar, R. D. (Eds.) Harwood Academic Publishers. Amsterdam. pp 255-275.
- Khamrin, P., Maneekarn, N., Peerakome, S., Yagyu, F., Okitsu, S., Ushijima, H. (2006). Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J. Med. Virol.* 78: 986-994.
- Kim, Y., Nielsen, P.R., Hodgins, D., Chang, K.O., Saif, L.J. (2002) Lactogenic antibody response in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes of inactivated bovine rotavirus vaccine. *Vaccine* 20: 1248-1258.
- Kimberly, J. C., Tanya, J. T., Zhichang, X., Mann, F. E., Bonnot, C. E., Woode, G. N. (1996). An unusual group A rotavirus associated with an epidemic of diarrhea among 3-month-old calves. *Ruminants* 208:552-4.
- Koutsky, L. A., Aula, K. A., Wheeler, C. M., Brown, D. R., Barr, E., Alvarez, F. B., Chiacchierini, L. M., Cansen, K. V. (2002) A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 347, 1645-1651.
- Labbé, M., Charpilienne, A., Crawford, S., Estes, M. K., Cohen, J., (1991). Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J. Virol.* 65: 2946-2952.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 913-949.
- Liebert, C. A., Watson, A. L., and Summers, A. O. (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 507-522.
- Liprandi, F., Gerder, M., Bastidas, Z., López, J. A., Pujol, H., Ludert, J. H., Joelsson D. B., Ciarlet M. A. (2003). Novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. *Virology* 315: 373-380.
- López, S., Espinosa, R., Greenberg, H.B., Arias, C. F. (1994). Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virology* 204: 153-162.
- Luckow, V. A., Lee, C. S., Barry, G. F., and Olins, P. O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67, 4566-4579.
- Martella, V., Ciarlet, M., Bányai, K., Cavalli, A., Corrente, M., Elia, G., Arista, S., Camero, M., Desario, C., Decaro, N., Lavazza, A., Buonavoglia, V. (2006). Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology* 346: 310-311.
- Martella, V., Ciarlet, M., Camarda, A., Pratelli, A., Tempesta, M., Greco, G., Cavalli, A., Elia, G., Decaro, N., Terio, V., Bozzo, G., Camero, M., Buonavoglia, V. (2003). Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotaviruses identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype. *Virology* 314:358-370.
- McNeal, M. M., Sestak, K., Choi, A.H.C., Basu, M., Cole, M. J., Aye, P. P., Bohm, R. P., Ward, R. L. (2005). Development of a rotavirus-shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype. *J. Virol.* 79:944-954.
- Mena J.A. (2004). Estudio del ensamble de pseudopartículas virales de rotavirus en el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Odeón, A. (2001). Diarrea neonatal de los terneros. Etiopatología, tratamiento y control. http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/sanidad/enf_dig/diarreaneon.htm (8 Dic. 2005)
- Okada, J., Urasawa, T., Kobayashi, N., Taniguchi, K., Hasegawa, A., Mise, K. Urasawa, S. (2000). New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus. *J. Med. Virol.* 60:63-69.

- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., and Luckow, V. A. (1992). *Baculovirus Expression Vectors: A laboratory manual* (New York, N. Y.: W. H. Freeman and Company).
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.*, 12: 357-358.
- Palomares, L. A., López, S., Ramírez, O. T. (2002). Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells. *Biotechnol. Bioeng.*78(6): 635-644
- Parwani, A. V., Tsunemitsu, H., Saif, L. J. (1994). Current research in bovine groups A and C rotaviruses. *Curr. Top. Vet. Res.* 1:115–32.
- Pattenden, L. K., Middelberg, A. P. J., Nielbert, M., Lipin, D. I. (2005). Towards the preparative large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends Biotech.* 23 (10): 523-529.
- Patton, J. T. and Spencer E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology*. 277: 217-225
- Rahman, M., Matthijnssens, J., Nahar, S., Podder, G., Sack, D. A., Azim, T., Ranst, M. V. (2005). Characterization of a novel P[25], G11 human Group A rotavirus. *J. Clin. Microb.* 43 (7): 3208-3212.
- Rao, C. D., Gowda, K., Reddy, B. S. (2000). Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology*.276:104–113.
- Reynolds, D. J., Morgan J. H., Chanter N., Jones P. W., Bridger J. C., Debney T. G., Bunch K. J. (1986). Microbiology of calf diarrhea in Southern Britain. *Vet. Rec.* 119: 34-39.
- Saif L. J., Fernández F. M. (1996). Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 174:S98–S106.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Commonly used techniques in molecular cloning. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 3
- Sereno, M. M., Gorziglia, M. I. (1994). The outer capsid protein VP4 of murine rotavirus strain Eb represents a tentative new P type. *Virology*.199:500–504.
- Shinosaki, K., Yamanaka, T., Tokieda, M., Shirasawa, H., Shimizu, B. (1996). Isolation and serial propagation of human group C rotaviruses in a cell line (CaCo-2). *J. Med. Virology*. 48: 48-52.
- Snodgrass, D. R., Terzolo, H. R., Sherwood, D, Campbell, I, Menzies, J. D., Synge, B. A. (1986). Aetiology of diarrhea in young calves. *Vet Rec.* 119: 31 - 34.
- Suzuki, Y., Sanekata, T., Sato, M., Tajima, k., Matsuda, Y. Nakagomi O. (1993). Relative frequencies of G (VP7) and P (VP4) serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotaviruses isolated in cell culture. *J. Clin. Microb.* 31 (11): 3046-3049.
- Villa, L. L., Costa, R., Petta, C., Andrade, R., Ault, K., Giuliano, A., Wheeler, C., Koutsky, L., Malm, C., Lehtinen, M. (2005). Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 6, 271-278.
- Wani, S. A., Bhat M. A., Ishaq S. M., Ashrafi M. A. (2004). Determination of bovine rotavirus G genotypes in Kashmir, India. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 23 (3), 931-936.

ANEXOS

ANEXO A. PROTOCOLO MUESTREO DE CAMPO



BIO-ZOO

MUESTREO PARA EL AISLAMIENTO DE ROTAVIRUS BOVINO.

M.V.Z. Roberto Néstor Mondragón García
Departamento Técnico

M.C. Elizabeth Rodríguez Amaro
Unidad de Biológicos

BIO-ZOO

1. SECCIÓN: Toma de muestras.

2. ESPECIE: Bovinos

3. PRODUCTO: Rotavirus bovino

4. FECHA INICIO DE TOMA DE MUESTRAS: _____

5. FECHA TERMINO DE TOMA DE MUESTRAS: _____

Metodología

1. Seleccionar terneros de 2 a 19 días de edad, afectados en los estadios iniciales de la enfermedad.
2. Seleccionar terneros de la misma camada que no hayan sido afectados, y que servirán como controles negativos.
3. Previa a la recolección, deberán anotarse todos los datos correspondientes a la Tabla 1.
4. Las heces deberán obtenerse del recto del animal mediante estimulación del esfínter anal.
5. Realizar la recolección en bolsas-guante de polietileno.
6. Identificar con **etiqueta** característica cada bolsa y almacenar inmediatamente en hielera o recipiente aislante.
7. Mantener la temperatura de las muestras cercana a los 4°C durante su transportación.
8. Enviar las muestras el mismo día de recolección al Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos, y el duplicado a la Unidad de Investigación y Desarrollo de TEBIOME.
9. Será suficiente muestrear un solo animal **por duplicado** del grupo de terneros afectados por establo o granja.
10. La **etiqueta** de identificación deberá contener los siguientes datos:
 - Nombre de la zona de recolección.
 - Nombre del rancho o granja de recolección.
 - En caso de muestrear más de un ternero, número distintivo que deberá coincidir con el de la Tabla 2.
11. En los comentarios u observaciones de la Tabla 3, deberá mencionarse si algún grupo ha sido vacunado contra rotavirus, y las características de la vacuna aplicada.
12. Finalmente, anotar fecha y responsable de la recolección.

GENERALES

Nombre del Establo o Granja: _____

Dirección: _____

Población: _____

Municipio: _____

Estado: _____

C.P. _____

E-mail: _____

Teléfono (s): _____

Fax: _____

Nº de Animales: _____

Raza: _____

Sexo # ♀ _____ # ♂ _____

Edades días _____

Fin Zootécnico: _____

Nombre del Propietario: _____

Dirección: _____

Tel: _____

Médico o encargado: _____

Tel: _____

Tabla 2. DATOS DE LOS TERNEROS.

N°	Identificación (Arete)	♀	♂	Edad	Raza	Establo/Rancho
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						

Tabla 3. COMENTARIOS/OBSERVACIONES

COMENTARIOS/OBSERVACIONES		

Fecha:

2005		
<i>Año</i>	<i>Mes</i>	<i>DIA</i>

Firma: _____
Nombre: M.V.Z

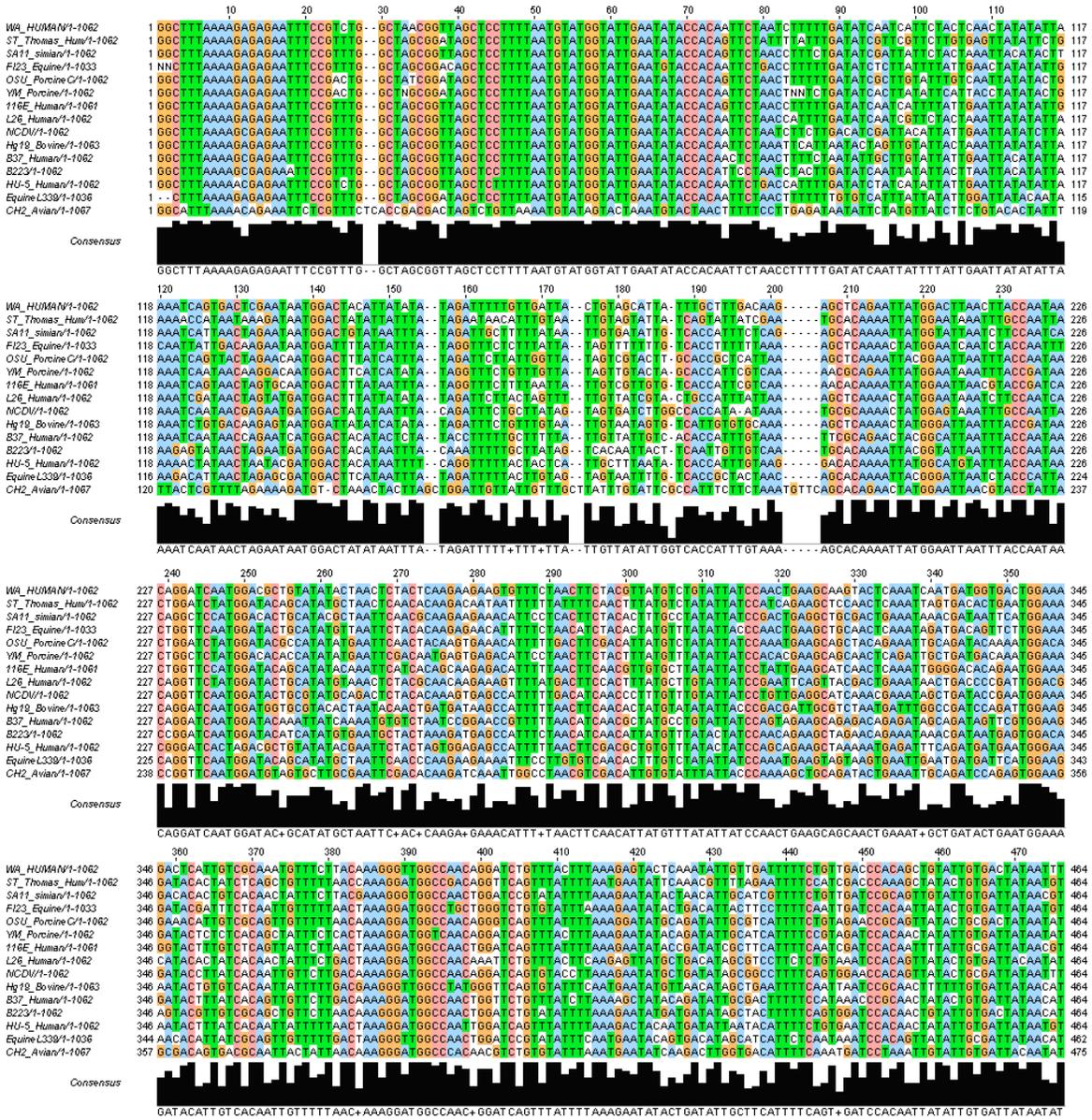
Firma: _____
Nombre: M.V.Z

CONTACTO UNAM

Dra. Laura A. Palomares
Instituto de Biotecnología UNAM
Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210, México
Apdo. Postal 510-3

Tel. +52 (55)56227863 or (777)3291863
Lab. +52 (55)56227617 or (777)3291617
Fax +52 (777)3138811

ANEXO B. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DEL SEGMENTO 9 DEL GENOMA DE ROTAVIRUS (Muestra representativa de los 15 genotipos G)



480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590
WA_HUMAN/N1-1062 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
ST_Thomas_Hum/1-1062 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
S411_simian/1-1062 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
F123_Equine/1-1033 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
OSU_Porcine/C1-1062 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
YM_Porcine/1-1062 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
116E_Human/1-1061 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
L26_Human/1-1062 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
NC/DV1-1062 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
H919_Bovine/1-1063 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
B37_Human/1-1062 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
8223/1-1062 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
HU-5_Human/1-1062 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
Equine_L339/1-1036 465 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 582
CH2_Avian/1-1067 476 AGTACATATGAAATGACCCAAATGTAATGAGATGTCAGAGTAGCGGATTAATTAATGAATGAATGGTATGTAACCCAAAGGATGAACATTAATATCAACAAACG 583

Consensus

AGT AT T AAT GAA AT AT GAT + C + A + T T T A G A A T T A G A T AT G T C T G A A T T G C C T G A T T A A T AT T G A A T G A A T G G T AT G T A A T C C A A T G G A T AT A A C A T T A T AT T A T C A C A A A C G T

600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710
WA_HUMAN/N1-1062 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
ST_Thomas_Hum/1-1062 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
S411_simian/1-1062 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
F123_Equine/1-1033 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
OSU_Porcine/C1-1062 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
YM_Porcine/1-1062 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
116E_Human/1-1061 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
L26_Human/1-1062 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
NC/DV1-1062 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
H919_Bovine/1-1063 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
B37_Human/1-1062 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
8223/1-1062 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
HU-5_Human/1-1062 583 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 701
Equine_L339/1-1036 581 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 699
CH2_Avian/1-1067 594 GGAATGATCAAAAGGATGATCGATGGGATCATCATGATGCGAAGGATGTCGCGCAAAACACAAACCTAGGGATAGGTCGCAACACGCAAAACGAGACATCTTGAAGAGCA 712

Consensus

GAT GAAGCAAT AAT GGAT AT CAAT GGGACAT CAT GT ACAA T AAAGT AT GT CCAC T AAAT ACACAACCT CT AGGAAT T GGAT GT + T AACT ACT GAT ACAGCACAT T T GAAGAAT

720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830
WA_HUMAN/N1-1062 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
ST_Thomas_Hum/1-1062 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
S411_simian/1-1062 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
F123_Equine/1-1033 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
OSU_Porcine/C1-1062 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
YM_Porcine/1-1062 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
116E_Human/1-1061 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
L26_Human/1-1062 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
NC/DV1-1062 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
H919_Bovine/1-1063 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
B37_Human/1-1062 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
8223/1-1062 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
HU-5_Human/1-1062 702 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 820
Equine_L339/1-1036 700 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 818
CH2_Avian/1-1067 713 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 831

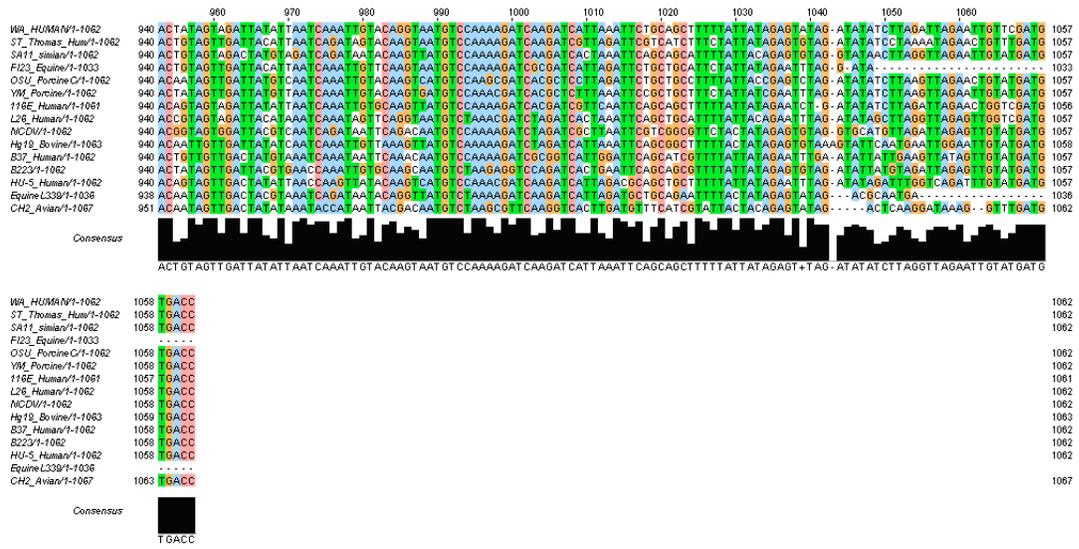
Consensus

T G C A C + G C T G A A A A A T T A G T A A T A A C T G A T G T T G A T G G A G T A A A T C A T A A A A T A G A T G T T A C A A C T A C T A C A T G A C T A T A A G A A T T G T A A A A A T T A G G C A C A G A G A A A A C G

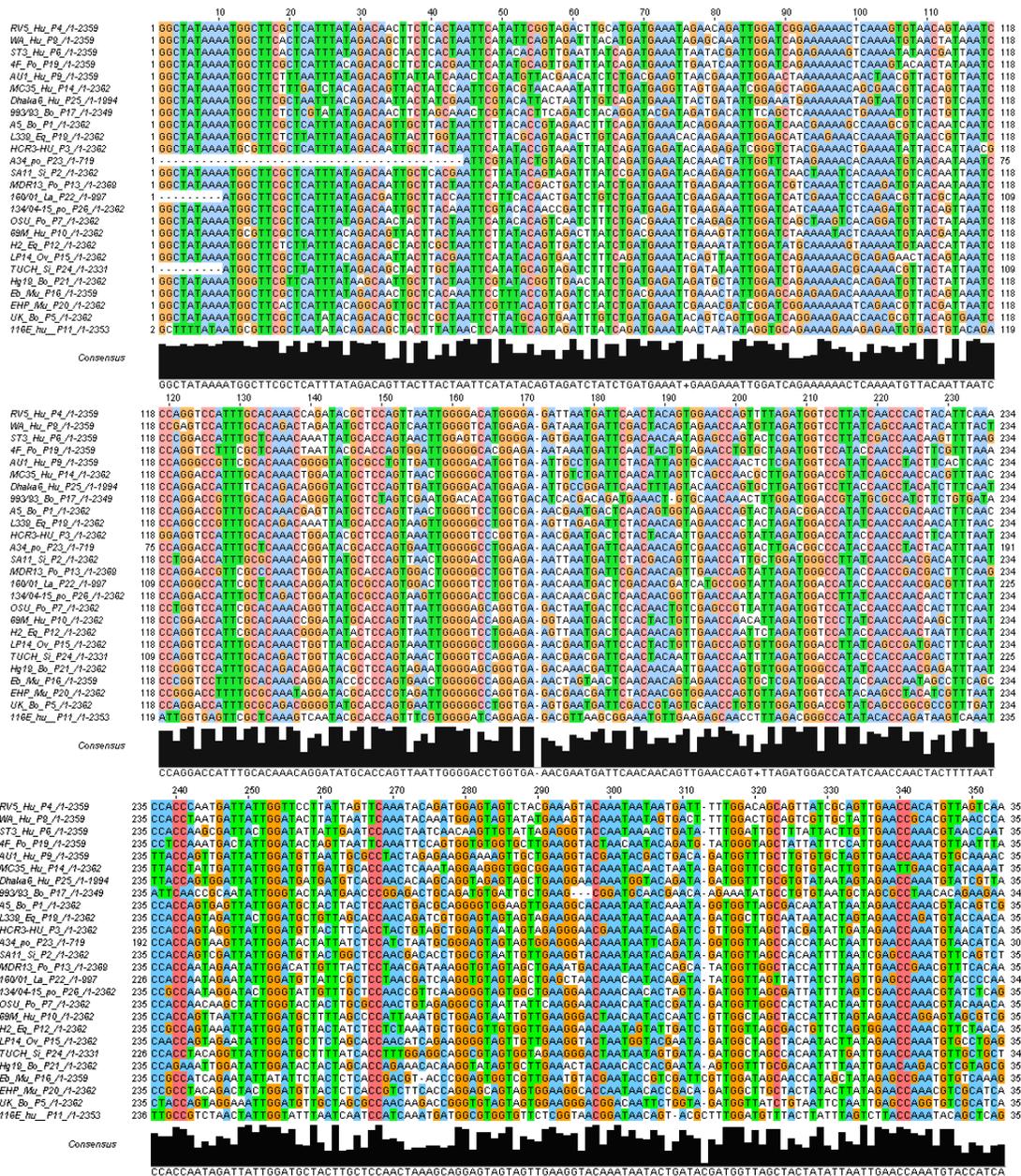
840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950
WA_HUMAN/N1-1062 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
ST_Thomas_Hum/1-1062 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
S411_simian/1-1062 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
F123_Equine/1-1033 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
OSU_Porcine/C1-1062 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
YM_Porcine/1-1062 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
116E_Human/1-1061 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
L26_Human/1-1062 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
NC/DV1-1062 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
H919_Bovine/1-1063 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
B37_Human/1-1062 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
8223/1-1062 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
HU-5_Human/1-1062 821 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 939
Equine_L339/1-1036 819 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 837
CH2_Avian/1-1067 832 TCGTGAAGATGAGAAATAGCTATAGGGATGTCGTTGATGGGATCAAAACAAATAAATAAATTAACCACTAGACATGACTATCGAAAATGTAAGAAATAGGCGCAAGAGAAAACG 950

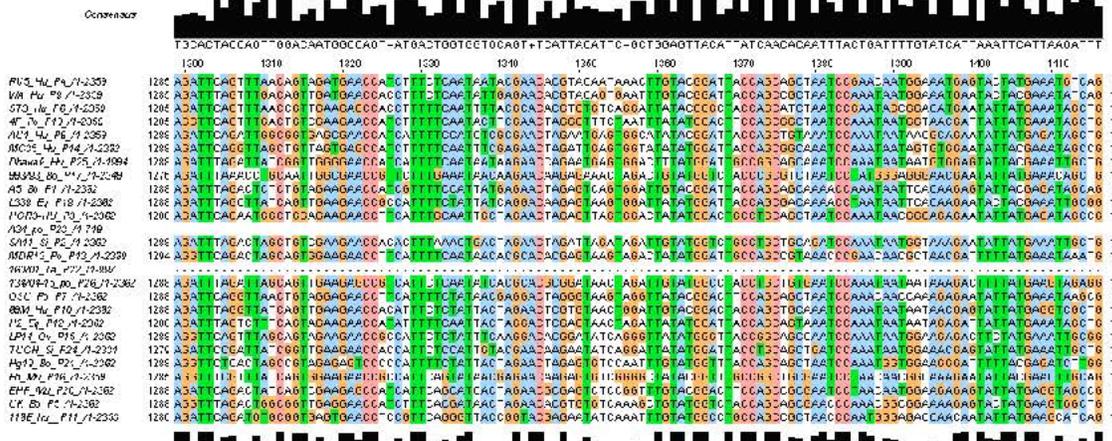
Consensus

T A G C A C T A A T C A A G T T G G T G T C T A A C T A C T A G A T A T A A C A C T G A T C C A A C A A C + C C C A C A A A C T G A A G A A T G A T G C G A A T A A A T T G A A A A A A T G T G C C A A G T T T T A T



ANEXO C. ALINEAMIENTO DE SECUENCIA DEL SEGMENTO 4 DEL GENOMA DE ROTAVIRUS (Muestra de los 26 genotipos P conocidos)





2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240

RVS_Hu_P4_1-2359 2108 ACCATTTGATGAAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2225
 WA_Hu_P9_1-2359 2108 GCCATTCGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2225
 ST3_Hu_P6_1-2359 2108 GCCCATTTGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2225
 4E_Po_P19_1-2359 2108 ACCCTTTGAGGTTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2225
 AU1_Hu_P9_1-2359 2108 TCCGTTTGAATGGACCAATTTAATAAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2225
 MC35_Hu_P14_1-2362 2111 TCCATTTGATGGAGAAAAATTAATAAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2225
 Dhaka6_Hu_P25_1-1994
 993/93_Bo_P17_1-2349 2093 GGATTTTGAATGAGAAAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2210
 AS_Bo_P1_1-2362 2111 GCCATTTGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2228
 L338_Eo_P19_1-2362 2111 ACCCATTTGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2228
 HCR3-HU_P3_1-2362 2111 ACCCATTTGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2228
 A34_po_P23_1-749
 SA11_Si_P2_1-2362 2111 ACCCATTTGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2228
 MDR13_Po_P13_1-2369 2117 ACCCTTTGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2234
 160/01_La_P22_1-997
 134/04-15_po_P26_1-2362 2111 ACCCTTTGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2228
 OSU_Po_P7_1-2362 2111 ACCCATTTGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2228
 69M_Hu_P10_1-2362 2111 ACCCATTTGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2228
 H2_Eo_P12_1-2362 2111 ACCCATTTGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2228
 LP14_Ov_P15_1-2362 2111 TCCATTTGATGGAGAAAAATTAATAAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2228
 TUCH_Si_P24_1-2331 2102 TCCGTTTGAATGGACCAATTTAATAAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2219
 Hy10_Bo_P21_1-2362 2111 ACCCATTTGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2228
 Eb_Mu_P16_1-2359 2111 ACCGTTTGAATGGACCAATTTAATAAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2225
 EHP_Mu_P20_1-2362 2111 ACCGTTTGAATGGACCAATTTAATAAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2229
 UK_Bo_P5_1-2362 2108 GCCATTCGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2228
 116E_nu_P11_1-2353 2100 AATGTTGATGACGAGATATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2217



2226 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350

RVS_Hu_P4_1-2359 2226 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2339
 WA_Hu_P9_1-2359 2226 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2339
 ST3_Hu_P6_1-2359 2226 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2339
 4E_Po_P19_1-2359 2226 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2339
 AU1_Hu_P9_1-2359 2226 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2339
 MC35_Hu_P14_1-2362 2226 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 Dhaka6_Hu_P25_1-1994
 993/93_Bo_P17_1-2349 2211 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2328
 AS_Bo_P1_1-2362 2226 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 L338_Eo_P19_1-2362 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 HCR3-HU_P3_1-2362 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 A34_po_P23_1-749
 SA11_Si_P2_1-2362 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 MDR13_Po_P13_1-2369 2235 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2348
 160/01_La_P22_1-997
 134/04-15_po_P26_1-2362 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 OSU_Po_P7_1-2362 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 69M_Hu_P10_1-2362 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 H2_Eo_P12_1-2362 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 LP14_Ov_P15_1-2362 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 TUCH_Si_P24_1-2331 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2331
 Hy10_Bo_P21_1-2362 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 Eb_Mu_P16_1-2359 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 EHP_Mu_P20_1-2362 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 UK_Bo_P5_1-2362 2229 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2342
 116E_nu_P11_1-2353 2218 ACGGTTTAAATTAATAAATTCGCCBAACGTGACCGGATCTCCAGTAAATCAGCGGATAAGACTTTAAAGACCTTAAATAATTAACGACAAATATGGAAATACCGTATTGA 2333



2340 2350 2360 2370 2380

RVS_Hu_P4_1-2359 2340 -ATGCACTCAGGATGTGACC 2359
 WA_Hu_P9_1-2359 2340 -ACGCTATTBAGGATGTGACC 2359
 ST3_Hu_P6_1-2359 2340 -GCTCTAAGGGATGTGACC 2359
 4E_Po_P19_1-2359 2340 -CCCTCAGAGGTTGTGACC 2359
 AU1_Hu_P9_1-2359 2340 -GTCTAATTAAGATGTGACC 2359
 MC35_Hu_P14_1-2362 2343 -GTCGCTAAGATGTGACC 2362
 Dhaka6_Hu_P25_1-1994
 993/93_Bo_P17_1-2349 2329 BGTGCTATBAGGATGTGACC 2349
 AS_Bo_P1_1-2362 2343 -AACGACGGGAGATGTGACC 2349
 L338_Eo_P19_1-2362 2343 -ABCCTATGAGGATGTGACC 2349
 HCR3-HU_P3_1-2362 2343 -AATTCAGAGGATGTGACC 2349
 A34_po_P23_1-749
 SA11_Si_P2_1-2362 2343 -AATTCAGAGGATGTGACC 2349
 MDR13_Po_P13_1-2369 2349 -ABTBTCTBAGGATGTGACC 2368
 160/01_La_P22_1-997
 134/04-15_po_P26_1-2362 2343 -AACGCTCAGAGGATGTGACC 2362
 OSU_Po_P7_1-2362 2343 -ABTGTCTBAGGATGTGACC 2362
 69M_Hu_P10_1-2362 2343 -ABCCTCAGAGGATGTGACC 2362
 H2_Eo_P12_1-2362 2343 -ABCCTCAGAGGATGTGACC 2362
 LP14_Ov_P15_1-2362 2343 -ABTGTCTBAGGATGTGACC 2362
 TUCH_Si_P24_1-2331
 Hy10_Bo_P21_1-2362 2343 -TTTGCCTBAGGATGTGACC 2362
 Eb_Mu_P16_1-2359 2340 -GAAGCTATBAGGATGTGACC 2359
 EHP_Mu_P20_1-2362 2343 -ABCCTCAGAGGATGTGACC 2349
 UK_Bo_P5_1-2362 2343 -ABCCTCAGAGGATGTGACC 2362
 116E_nu_P11_1-2353 2334 -GTTGCTATBAGGATGTGACC 2353



• MUESTRA 47 (G6)

[gi|25990811|gb|AF443298.1](#) Bovine rotavirus isolate IND (P[5]G6) major outer capsid glycoprotein (VP7) gene, partial cds
Length=905

Score = 291 bits (147), Expect = 1e-75
Identities = 255/273 (**93,4%**), Gaps = 2/296 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 172 ATAAATGCGCANAATTNTGGAGTGAGTTTGCCAATTACNNGTTCGATGGGATACTGCGTA 231
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 164 ATAAATGCGCAGAATTATGGAGTGAAATTTGCCAATTACAGGTTCAATGG-ATACTGCATA 222

Query 232 TGCACAATTCTNCNCANAGNGAGCCATTTTTAACATCANCTCTATGTTTGNATTATCCTA 291
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 223 CGCA-AATTCTACGCAAAGTGAGCCATTTTTAACATCAACTCTTTGTTTGTATTATCCTG 281

Query 292 TTGAGGCNCNNACGAAATNNNTGATACCGAANGGAAAGATACCTTATCACAACCTGTTCT 351
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 282 TTGAGGCATCAAACGAAATAGCTGATACTGAATGGAAAGATACCTTATCACAACCTGTTCT 341

Query 352 TGACGAAAGGTTGGCCAACCGGATCGGNGTANTTTGAAGAATATACTGATNTAGCGGCTT 411
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 342 TGACAAAAGGATGGCCAACAGGATCGGTGTACTTTAAAGAATATACTGATATAGCGGCTT 401

Query 412 TTTCAAGTNAACCNCAACTGTATTGTGACTATAATTTANTTTTTAANGAAATATGAT 467
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 402 TTTCAAGTAGAACCACAGCTGTACTGTGATTATAATTTAGTTTTTAATGAAATATGAT 457

```

• MUESTRA 49 (P[5])

[gi|29823911|emb|X79795.2|BRGS4](#) Bovine rotavirus A gene for cleavage protein VP8, genomic RNA length=790

Score = 137 bits (69), Expect = 7e-29
Identities = 199/222 (**90%**), Gaps = 1/250 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 192 AAACACCAAATGCCACAACNANAGGATANATTGTANCGAATTATGCATCANGTGAGGTAA 251
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 539 AAACCCCAAATGCCACGACCAAAGGATATATTGTAACGAATTATGCATCAGTTGAGGTAA 598

Query 252 GGCCATATGGTGATTTTTACATGATNTCAAGATCNCAAGAGTNGGTTTGCANTGANTANA 311
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 599 GGCCATATAGTGACTTTTATATAATTTCAAGATCACAGGAGTCGGCATGCACTGAGTATA 658

Query 312 TNAANCACNGACTGCCACCTATCCNAAATNCCAGAAATGTAGTGNCTGTGNCGGTATCN 371
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 659 TAAATAACG-GACTGCCACCTATTTCAGAATACCAGGAATGTAGTGCTGTGGCAATATCG 717

Query 372 GCTAGATNAATGAAACCAANNGAAGTACNNGCGAATGNAGATATGTANTNTCNAAAAC 431
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 718 TCAAGATCAATTAACCAAGAGAAGTGCAGGCTAATGAAGATATTGTAGTTTCAAAGACT 777

Query 432 TCACGTGGA 441
          ||| ||| |||
Sbjct 778 TCATTGTGGA 787

```


• **SCOURGUARD (P[1])**

[gi|1519242|gb|U65924.1|GAU65924](#) Group A rotavirus protease sensitive
 capsid protein VP4 mRNA,
 complete cds
 Length=2362

Score = 668 bits (337), Expect = 0.0
 Identities = 382/387 (**98,7%**), Gaps = 4/394 (1%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query   37   AGCCGATTTAAANTCGGTANTGTGTACAGGTAGGGGANTATAGTGTTTGCCTTCCNCTT   96
      |||
Sbjct  1125  AGCCGATTTAAATTCGGTAATGTGTACAGG-AGGTGACTATAGT-TTTGCCTTCCACTT   1182

Query   97   GGC TCATTAGTCCAGTTATGACTGGGGGTGCTGTGTTCATTGCATTCNGCNGGNGTAACTT   156
      ||
Sbjct  1183  GG-TCATTA-TCCAGTTATGACTGGGGGTGCTGTGTTCATTGCATTCAGCAGGTGTAACCTT   1240

Query   157  TATCAACGCAGTTTACAGATTTTCGTATCATTAAATTCAGTACTGAGATTTAGATTTAGATTAT   216
      |||
Sbjct  1241  TATCAACGCAGTTTACAGATTTTCGTATCATTAAATTCAGTACTGAGATTTAGATTTAGATTAT   1300

Query   217  CAGTAGAAGAACC GCCGTTCTCAATTCACGGACCAGAGTTAGTGGATTGTATGGACTTC   276
      |||
Sbjct  1301  CAGTAGAAGAACC GCCGTTCTCAATTCACGGACCAGAGTTAGTGGATTGTATGGACTTC   1360

Query   277  CAGCGGCAAGACCGAATAATTCACAAGAATATTATGAGATAGCTGGGAGATTTTCATTAA   336
      |||
Sbjct  1361  CAGCGGCAAGACCGAATAATTCACAAGAATATTATGAGATAGCTGGGAGATTTTCATTAA   1420

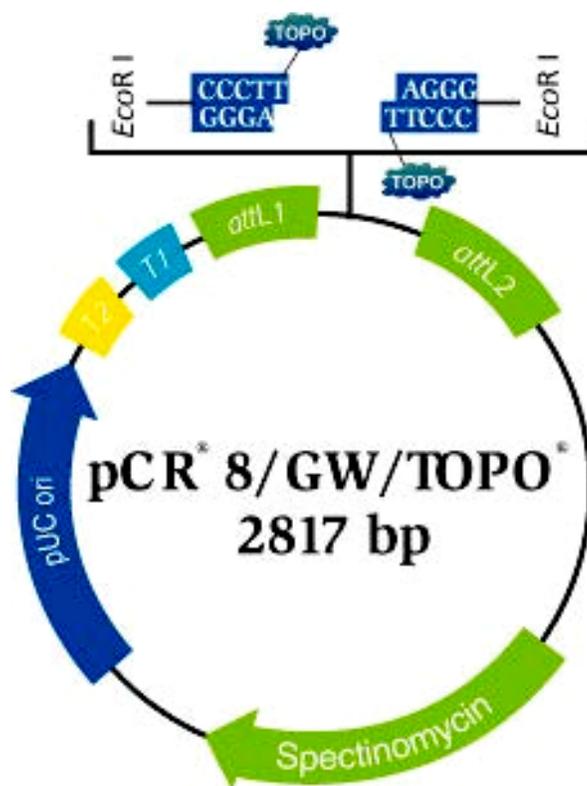
Query   337  TATCACTCGTACCGTCAAATGATGATTATCAGACACCAATAATAAATTCAGTCACTGTAC   396
      |||
Sbjct  1421  TATCACTCGTACCGTCAAATGATGATTATCAGACACCAATAATAAATTCAGTCACTGTAC   1480

Query   397  GACAAGATTTAGAACGACAATTAGGAGAACTAAG   430
      |||
Sbjct  1481  GACAAGATTTAGAACGACAATTAGGAGAACTAAG   1514

```


ANEXO E. VECTORES

PCR[®]8/GW/TOPO[®]



Características del vector PCR[®]8/GW/TOPO[®]

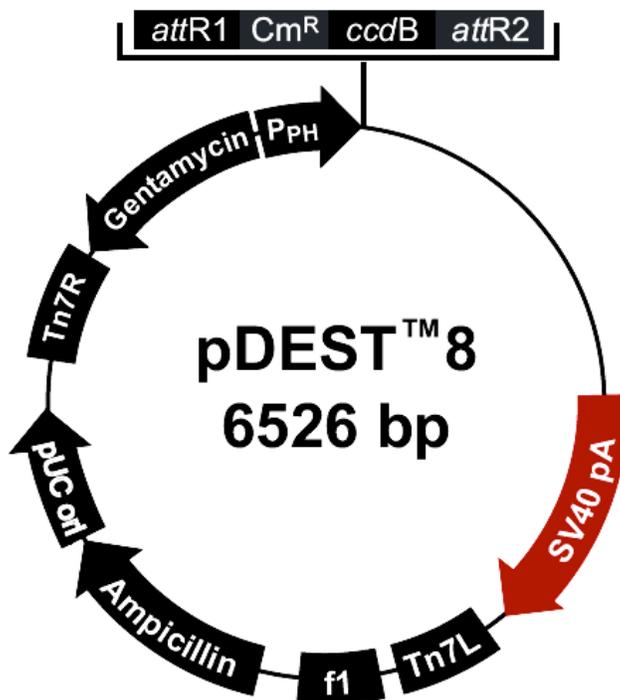
PCR[®]8/GW/TOPO[®] (2817 pb) contiene los siguientes elementos:

Tabla E.1 Características del vector PCR[®]8/GW/TOPO[®]

Característica	Propiedad
Secuencias de terminación de la transcripción <i>rrnB</i> T1 y T2	Reduce la toxicidad potencial en <i>E. coli</i> previniendo la expresión basal del producto de PCR

Característica	Propiedad
Promotor T7 / Sitio para oligos	Permite la transcripción <i>in vivo</i> y la secuenciación del inserto.
Sitio para oligos M13 <i>forward</i> (-20)	Permite la secuenciación del inserto
Sitio para oligos GW1	Permite la secuenciación del inserto
Sitios <i>attL1</i> y <i>attL2</i>	Secuencias de recombinación derivadas del bacteriófago λ que permiten clonación por recombinación del gen de interés en la construcción entrante con un vector de destino Gateway [®] (Landy, 1989)
Sitio de clonación TOPO [®]	Permite clonación rápida del producto de PCR amplificado con Taq DNA polimerasa
Sitio para oligos GW2	Permite la secuenciación del inserto
Sitio para oligos M13 <i>reverse</i>	Permite la secuenciación del inserto
Promotor para espectinomicina	Permite la expresión del gen de resistencia de espectinomicina en <i>E. coli</i>
Gen de resistencia a espectinomicina (<i>aadA1</i>)	Permite la selección del plásmido en <i>E. coli</i> (Liebert <i>et al.</i> , 1999)
Origen de replicación pUC (<i>ori</i>)	Permite replicación de alta copia y mantenimiento en <i>E. coli</i>

pDEST[®]8



Características del vector pDEST[®]8

pDEST[®]8 (6526 pb) contiene los siguientes elementos:

Tabla E.2 Características del vector pDEST[®]8

Característica	Propiedad
Promotor de poliedrina (P _{PH})	Permite una expresión eficiente de alto nivel, de la proteína recombinante en células de insecto (O'Reilly <i>et al.</i> , 1992)
Elementos mini-Tn7 (TN7L y Tn7R)	Permiten la transposición sitio-específica del gen de interés en un bácido propagado en <i>E. coli</i> . (Luckow <i>et al.</i> , 1993)
Sitios <i>attR1</i> y <i>attR2</i>	Secuencias de recombinación derivadas del bacteriófago λ que permiten clonación por recombinación del gen de interés desde una clona entrante Gateway [®] (Landy, 1989)
Gen de resistencia a cloranfenicol	Permite selección de colonias de las clonas expresadas
Gen <i>ccdB</i>	Permite la selección negativa
Secuencia de poliadenilación de SV40	Permite una terminación eficiente de la transcripción del mRNA.
Origen de replicación pUC (<i>ori</i>)	Permite replicación de alta copia y mantenimiento en <i>E. coli</i>
Promotor <i>bla</i>	Permite la expresión del gen de resistencia a la ampicilina
Gen de resistencia a ampicilina (<i>bla</i>)	Permite la selección de transformantes en <i>E. coli</i>
Gen de resistencia a gentamicina	Permite la selección de transformantes que contienen el bácido con DNA recombinante

ANEXO F. MEDIOS DE CULTIVO

Medio Luria Bertani (LB)

Triptona	10.0 g
Extracto de Levadura	5.0 g
NaCl	10.0 g

Se disuelve en agua hasta completar 1 L y se ajusta pH a 7.0 con NaOH 10N. Para el medio LB-Agar, a la mezcla anterior se adicionan 15.0 g de agar. El medio de cultivo es esterilizado a 121°C por 20 min.

Medio SOC

Triptona	4.0 g
Extracto de Levadura	1.1 g
NaCl	117.0 mg
KCl	149.2 mg
MgCl ₂	190.4 mg
MgSO ₄	192.0 mg
Glucosa	720.0 mg
Agua	c.s.p 200 mL

Se disuelven los reactivos completamente y el medio se esteriliza por filtración con membranas de 0.22 µm. Se hacen alícuotas de 2 y 50 mL.

Medio TNM-FH

El medio de cultivo en polvo (Grace's insect cell culture medium, GIBCO BRL) se disuelve en 950 mL de agua destilada estéril. Luego se adicionan 0.35 g de NaHCO_3 , 3.33 g de lactoalbúmina hidrolizada y 3.33 g de Extracto de levadura. Se ajusta el pH a 6.1 con NaOH 1.0 N.

Este medio se esteriliza por filtración con membranas de 0.22 μm , separando volúmenes de 500 mL. Si se desea preparar un medio TNMFH con 10% de FBS se agregan 55.6 mL de suero fetal bovino estéril por cada 500 mL de medio.