



---

---

**Universidad Autónoma del Estado de México**

**Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos  
Naturales**

**Diagnóstico molecular de Norovirus y Astrovirus  
en conejos de la zona sur oriente del Estado de  
México**

**TESIS**

**Que para obtener el título de Maestra en Ciencias  
Agropecuarias y Recursos Naturales**

Presenta:

**M.V.Z. Gabriela López Aguado Almazán**

Comité de tutores:

Dra. Linda Guiliana Bautista Gómez

Dr. José Simón Martínez Castañeda

Dr. Camilo Romero Núñez

Amecameca, Estado de México, Abril de 2017

# Índice

	Página
1. Introducción	1
2. Revisión de literatura	2
2.1 Replicación y modo de infección	5
2.2 Apoptosis	7
2.3 Clasificación	10
2.3.1 Virus RNA	11
2.4 Virus RNA monocatenarios polaridad positiva	12
2.5. Norovirus	13
2.5.1 Genoma	14
2.5.2 Mecanismos de replicación e infección	18
2.5.3 Diagnóstico molecular de Norovirus	20
2.6 Astrovirus	21
2.6.1 Características	21
2.6.2 Genoma	22
2.5.4 Diversidad	24
2.5.5 Replicación	26
2.5.6 Identificación molecular de Astrovirus	27
2.5.7 Relación Astrovirus-Norovirus	28
3. Planteamiento del problema	30
4. Justificación	31
5. Hipótesis	32
6. Objetivos	33
6.1 General	33
6.2 Específicos	33

7. Material y método	34
7.1 Localización del área de estudio	34
7.2 Tipo de investigación	34
7.3 Población bajo estudio	34
7.4 Tipo de muestreo	34
7.5 Toma de muestras	35
7.6 Procesamiento de las muestras	35
7.7 Análisis de resultados	39
8. Discusión	48
9. Conclusiones	51
10. Artículo	52
11. Referencias bibliográficas	53
12. Anexos	70
12.1 Proceso de RT	70
12.2 Reactivos de PCR Astrovirus y Norovirus	71
12.3 Protocolo de clonación	72
12.4 Mapa y secuencia de la región promotora y sitio múltiple de clonación del vector	77
12.5 Secuencias y números de acceso	79

## Índice de figuras

	Página
Figura 1. Gel de agarosa 2x Astrovirus	31
Figura 2. Gel de agarosa 2x Norovirus	31
Figura 3. Gel de agarosa 3x purificados	31
Figura 4. Placa de medio L.B Astrovirus	32
Figura 5. Placa de medio L.B Norovirus	32
Figura 6. Gel de agarosa 3x clonas	33
Figura 7. Gráfico de barras para muestras de Astrovirus	34
Figura 8. Gráfico de barras para muestras de Norovirus	34
Figura 9. Comparación de secuencias en la base de datos del Gen Bank para Astrovirus	38
Figura 10. Comparación de secuencias en la base de datos del Gen Bank para Norovirus	38
Figura 11. Alineación múltiple de secuencias Astrovirus	39
Figura 12. Alineación múltiple de secuencias Norovirus	39
Figura 13. Árbol filogenético Astrovirus	41
Figura 14. Árbol filogenético Norovirus	42

## Índice de tablas

### Página

Tabla 1. Presencia y asociación de muestras positivas a Astrovirus y Norovirus, en los municipios que conforman la zona sur-oriente del Estado de México	35
Tabla 2. Secuencias obtenidas de Astrovirus en conejos con signología entérica	36
Tabla 3. Secuencias obtenidas de Norovirus en conejos con signología entérica	37

## 1. INTRODUCCIÓN

Astrovirus son pequeños virus tipo RNA que miden aproximadamente de 28 a 30 nanómetros de diámetro, infecta a conejos causando signología entérica y muerte por infecciones severas, lo cual genera una disminución de la producción y pérdidas económicas a los productores (Stenglein *et al.*, 2012).

Se ha identificado en diversas especies como lo son: humanos, bovinos, ovinos, porcinos, aves, mamíferos acuáticos y murciélagos, este último sirvió como modelo para demostrar su existencia en conejos. Su identificación se realiza mediante la amplificación de diferentes secciones de su genoma, a través de la técnica de RT-PCR, logrando su clasificación (Martella *et al.*, 2011).

Norovirus son virus RNA sentido positivo cadena sencilla, se ha reportado en humanos como la primera causa de enfermedades entéricas de origen vírico a nivel mundial. La importancia de su estudio molecular radica en que contiene diversos genotipos, debido a la capacidad de recombinación que le confiere por el número de proteínas que contiene su genoma. Su estudio en conejos no se ha reportado, aunque comparte características con el humano que es la afinidad por los grupos HGBA de las células epiteliales específicamente el grupo H, sugiriendo que Norovirus podría tener las condiciones idóneas para su replicación en conejos (Thorne y Goodfellow, 2014).

El Estado de México es una identidad alta productora cunícola, principalmente la zona sur oriente del Estado de México (SAGARPA, 2015), lo que nos conduce a profundizar en este estudio debido al aumento de riesgo y la necesidad de conocimiento de agentes virales que pueden estar afectando a la cunicultura y especializar el estudio en México debido a que las cepas infectantes en el caso de Astrovirus podrían ser distintas a las reportadas.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

Los virus son definidos como biosistemas elementales que poseen algunas propiedades de los organismos como genoma y se adaptan a condiciones ambientales. Pertenecen a la biología por que se conforman por genes, se replican, evolucionan, adaptan a huéspedes y nichos ecológicos. Sin embargo, no pueden capturar ni almacenar energía y no son funcionalmente activos extracelularmente. Son patógenos, aunque no deben considerarse microorganismos patógenos ya que no tienen vida. Un virus pasa a ser parte de un sistema vital sólo después de infectar a una célula y de que su material genético se integra al genoma de ésta (Regenmortel y Mahy, 2004).

El origen de los virus es sustentado en diversas hipótesis: la hipótesis de escape o progresiva con la habilidad de los virus para entrar y salir de diferentes células, esta teoría se conoce de esta forma porque existe salida de los componentes celulares mínimos necesarios para conformar un sistema autosuficiente y capaz de replicarse, la segunda es la de reducción o regresiva donde el virus deriva directamente de organismos, denominada así porque existe una pérdida progresiva de funciones celulares; la teoría de co-evolución, toma como base la incapacidad de los virus de no poderse replicar de manera extracelular, por lo tanto la ascendencia de ambos se encuentra entrelazada, siendo confirmada con la comparación de secuencias virales y celulares, obteniendo como resultado un ancestro común LUCA (Último Ancestro Común Universal). Un nuevo postulado menciona que el origen de los virus es polifilético denominado: "Tres células de ARN, tres virus de ADN" (Claverie, 2006; Forterre, 2006; Durzyńska y Gózdicka, 2015).

Evolutivamente existen tres clases de genes virales que se pueden distinguir: los genes con homólogos detectables en las formas de vida celular, genes específicos del virus como orphan's y genes con homólogos distantes en los organismos celulares (Koonin *et al.*, 2006 citado en Durzyńska y Gózdicka, 2015).

Los virus son clasificados por algunas de sus características como: la forma infectiva, signología que ocasionan y la forma en que se introducen a sus huéspedes (Gibbs, 2013), son más pequeños que las células procariontes o eucariontes, tienen estructura simple y estática, no tienen metabolismo propio, algunos infectan células procariontes denominados virus bacteriófagos y otros células eucariontes. Respecto a su mecanismo infectivo algunos virus destruyen a las células y otros permanecen latentes en su interior, sus genomas codifican información mínima para asegurar la replicación de su genoma y empaquetamiento para la producción de proteínas virales y subvertir funciones celulares que permitan la producción de viriones (Carter *et al.*, 2005).

Están compuestos por un ácido nucleico ya sea de tipo DNA o RNA , donde el virus contiene la información específica y el potencial operacional para modificar la maquinaria de la célula infectada y dirigir la producción específica de los componentes de las nuevas partículas virales. Codifican proteínas que constituyen a la cápside y proteínas no estructurales, que son esenciales para la replicación viral dentro de la célula huésped (Prasad y Schmid, 2012; Zimmer, 2006).

Algunos virus contienen una membrana lipídica externa llamada envoltura, esta membrana por lo regular es parte de la membrana plasmática de la célula hospedera, que es adquirida al salir nuevas partículas virales de la célula en un proceso de gemación (Uribarren, 2015).

La matriz viral se encuentra ubicada entre la envoltura y la cápside, las funciones atribuidas son las de ensamblaje viral y estabilización de la envoltura lipídica. Las proteínas de la matriz de los diferentes virus suelen ser estructurales y evolutivamente relacionadas (Meng *et al.*, 2008).

La cápside es una cubierta de proteína viral constituida por cápsomeros. Las principales funciones de la cápside son: proteger, transportar y liberar el genoma.

En el caso de cápsides de virus bacteriófagos necesitan soportar altas presiones del ADN, obteniendo como resultado el empaquetamiento y su consecuente confinamiento dentro de la cápside (Ross *et al.*, 2007; Uribarren, 2015).

Los cápsomeros se componen de un número variable de proteínas de una a seis. El número y posición de los cápsomeros determinan el tipo de cápside por la cual se conforma el virus, la cápside tipo icosaédrica la comprenden a aquellos virus con forma de esfera o icosaédro, compuesta por una capa de subunidades proteicas, divididas en doce cápsomeros que puede contener cinco subunidades (pentámeros) o veinte cápsomeros que pueden tener seis subunidades (hexámeros) (Gomez *et al.*; 2013; Zandy *et al.*, 2004).

En la simetría helicoidal, subunidades de proteínas idénticas denominadas protómeros, se autoensamblan en una matriz helicoidal que rodea al ácido nucleico siguiendo una trayectoria de espiral. La nucleocápside forma varillas rígidas, alargadas o filamentos flexibles. El virus helicoidal más estudiado es el virus de mosaico de tabaco (Gelderblom, 1996 citado en Ting *et al.*, 2014).

La nucleocápside es un ácido nucleico más la cápside, se encuentra compuesta por proteínas estructurales que son las encargadas del empaquetamiento del ácido nucleico del genoma viral y proteínas no estructurales que son asociadas al proceso de transcripción del genoma; por ejemplo la transcriptasa reversa de los retrovirus realiza copias de ADN a partir de un molde de doble cadena de ARN que se selecciona para el empaquetamiento y replicación (Berkowitz *et al.*, 1996 citado en Sun *et al.*, 2014; Carter, 2005).

## 2.1 REPLICACIÓN Y MODO DE INFECCIÓN

La persistencia viral requiere de dos estrategias fundamentales: la primera es única de la replicación viral al no eliminar a su hospedero, el patógeno causa poco o ningún daño a la célula y la segunda el virus necesita una respuesta inmune débil de parte del individuo. Por otro lado los virus pueden alterar o interferir con el procesamiento de péptidos virales ante las células presentadoras de antígenos, evitando así la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad, que es necesario para la activación de células T (Oldstone, 2009).

La interacción entre los virus y sus células hospederas está íntimamente ligada al ciclo de replicación viral. La interacción del virus con los componentes y las estructuras celulares durante el proceso de replicación influye en como el virus causa la enfermedad. La mayoría de las infecciones no causan patología celular o alteración morfológica aparente, sin embargo la replicación puede causar citopatología como: redondeamiento celular, desprendimiento, transformación maligna o lisis celular (Hunt, 2010).

Para que ocurra el ciclo de replicación viral e infección, los virus pasan por varios estadios, siendo el primero la unión y penetración a la membrana plásmica de la célula hospedera, posteriormente se introduce al citosol, libera el material genético para que se lleve a cabo la replicación (Samji, 2009; Grove y Marsh, 2011).

El contacto inicial entre un virus y una célula huésped está mediado por componentes de la superficie viral, glicoproteínas de membrana o sitios de la cápside viral (Marsh y Helenius, 2006) de igual forma es dependiente de factores de fijación de compuestos glicolípidicos, glicoproteínas o proteoglicanos como heparán sulfato, encontrados en la superficie de la célula diana (De Haan *et al.*, 2005; Vlasak *et al.*; 2005). Estas primeras interacciones pueden carecer de especificidad y sirven al virus para una retención inicial y reclutar receptores específicos que estimulen reacciones que impulsen a reacciones que conduzcan

a la entrada. Los receptores son moléculas de superficie celular que proporcionan funciones esenciales para una infección productiva. En la mayoría de veces los receptores orientan eficazmente a los virus a endocitosis (Grove y Marsh, 2011).

La endocitosis es el proceso mediante el cual ingresan a la célula solutos, moléculas y partículas de distintos tipos, Este proceso consiste en la invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula cuyo contenido es transportado del exterior al interior de la célula. Existen varios criterios para clasificar los diferentes tipos de endocitosis, dependiendo el tipo de molécula que internalice: toxina, virus, ligando o receptor y el componente que cubra a la vesícula: clatrina, caveolina, flotina o independiente de clatrina y clatrina. La participación de las GTPasas es importante en el mecanismo de escisión de la vesícula de la membrana (Gutiérrez y López, 2010).

La endocitosis dependiente de clatrina es la más caracterizada en virus, la clatrina es un complejo proteico formado por tres cadenas ligeras y tres cadenas pesadas, que constituyen una unidad llamada: trípode de clatrina. Este complejo es reclutado a la membrana plasmática por proteínas adaptadoras, entre ellas se encuentra el complejo AP-2 conformado por cuatro subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ 2, 2 y  $\delta$ ) que interactúa con clatrina a través de la subunidad  $\beta$ 2, estimulando su polimerización generando una malla de clatrina que cubrirá a la vesícula. La fisión de la cubierta con clatrina es controlada por GTPasa dinamina, actuando como una enzima que utiliza GTP, generando la fuerza necesaria para estrangular el cuello y escindir las vesículas de la membrana (Gutiérrez y López, 2010; Traub, 2009).

La caveola son estructuras invaginantes que expresan caveolina, proteínas que son capaces de formar la capa caveolar, que sirve como vía endocítica a los virus. Existen diferentes tipos de proteínas de caveola: Cav1a, que contiene tirosina para su fosforilación y transporte, Cav1b, CAV2 y CAV3; todas comparten la misma conformación un dominio N y C terminal, encontrándose de citoplasma a transmembrana (Lajoie y Nabi, 2007).

La replicación es una etapa fundamental en el ciclo de replicación viral y es dependiente del tipo de genoma que contenga el virus. En el caso del virus tipo RNA de cadena sencilla es necesario la síntesis de una cadena de RNA intermediaria y complementaria, mientras que para los retrovirus su cadena intermediaria es de DNA. Para virus RNA monocatenario sentido positivo, cuentan con genes policistrónicos, para la producción de RNA sub-genómico, que le permite la expresión controlada de un subconjunto de genes virales (White *et al.*, 2011; Sola *et al.*, 2011).

El ensamblaje de la cápside viral es un proceso complejo de oligomerización, regulado por las interacciones de las subunidades proteicas, también requiere la incorporación de proteínas de andamiaje y la interacción del genoma viral con las subunidades, para la promoción y dirección del proceso. Una vez ensamblada la cápside se somete a maduración, que implica reordenamientos conformacionales que aumentan la estabilidad de la partícula. La cápside madura es un complejo proteico capaz de proteger al genoma, culminando el ciclo con la liberación de las nuevas partículas virales (Mateu, 2013).

## **2.2 APOPTOSIS**

Durante el proceso de co-evolución patógeno-hospedero los virus han desarrollado una serie de estrategias para superar las defensas bioquímicas e inmunológicas del huésped, por lo tanto los virus han adquirido la capacidad de evitar la apoptosis de la célula huésped, controlar las respuestas inflamatorias y evadir reacciones inmunes. La eliminación de las células infectadas a través de la muerte celular programada es uno de los mecanismos de defensa más ancestrales contra la infección, la desactivación de la apoptosis de la célula huésped podría representar un paso casi obligado en el ciclo viral. Por el contrario, los virus pueden tomar ventaja de estimular la apoptosis, ya sea para eliminar las células no infectadas del sistema inmunológico o para inducir la ruptura de las células infectadas, lo que favorece la difusión viral. Varios polipéptidos virales son

homólogos de las proteínas reguladoras de la apoptosis derivados del huésped, tales como miembros de la familia Bcl-2 (Galluzi *et al.*, 2008).

La muerte celular durante la replicación viral puede ser causada por diversos factores. El factor más probable es la inhibición de la síntesis celular basal de biomoléculas tales como proteínas. Durante el ciclo de replicación, el virus induce a la maquinaria celular a fabricar principalmente productos virales, más que aquellos que la célula fabricaría normalmente. Como resultado de esto, la célula sintetiza predominantemente productos virales y los productos celulares necesarios para la supervivencia de la célula, que no están presentes o lo están pero en cantidades demasiado bajas como para mantener su viabilidad. Además de la carencia de productos celulares esenciales, este evento resulta en la acumulación excesiva de productos virales (ARN, ADN, proteínas), que pueden ser tóxicos para las células. En la fase de liberación del ciclo de replicación de algunos virus se estimula la apoptosis de la célula hospedera. En otras circunstancias la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares causa daños a las membranas de los lisosomas y por consecuencia la liberación de enzimas hidrolíticas, provocando la muerte celular (Carter *et al.*, 2005).

Existen otras alternativas de muerte celular, la necrosis es considerada un proceso de muerte celular pasiva, como resultado de perturbaciones a su ambiente, culminando en un liberación descontrolada de factores que estimulan inflamación (Fink y Cookson, 2005). La oncosis, es un término que se utiliza para describir un proceso que conduce a la necrosis celular incluyendo cariólisis y distención, mientras que en la apoptosis lleva a la muerte celular mediante un proceso de encogimiento, picnosis y cariorrexis. Además existen otros factores con los cuales se pueden diferenciar la apoptosis de la necrosis, aunque pueden ocurrir de forma simultánea, como la intensidad y duración, grado de depleción de ATP y disponibilidad de las caspasas. La necrosis es un proceso no controlado y pasivo, mientras que la apoptosis es dependiente de energía. Las lesiones celulares necróticas están mediadas por dos mecanismos principales: interferencia con el

suministro de energía celular y daño directo a las membranas celulares (Zeiss, 2003 citado en Elmore, 2007).

La vía intrínseca y extrínseca son los procesos de apoptosis más estudiados (Duprez *et al.*, 2007). La vía intrínseca para la muerte celular programada implica señales intracelulares no mediadas por receptor. Los estímulos para esta vía incluyen infecciones virales o daños a la célula por toxinas, radicales libre y daño al ADN. Estos estímulos inducen cambios en la membrana mitocondrial interna que resulta en la pérdida de potencial transmembrana, provocando la liberación de proteínas al citosol (Ashkenazi *et al.*, 2008). La liberación de citocromo C, resulta en la formación del apoptosoma el cual activara a la caspasa indicadora 9, lo que conduce a la activación de la caspasa ejecutora 3 (Galluzi *et al.*, 2010).

Las proteínas pro-apoptóticas activaran también la translocación en el núcleo celular induciendo a la fragmentación del ADN. La regulación de eventos pro-apoptóticos es regulado en la mitocondria por p53 y miembros de la familia Bcl-2, actuando como proteínas anti o pro-apoptóticas incluyendo a Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim y Bik (Elmore, 2007).

La vía extrínseca es mediada por un subgrupo de receptores de Factor de Necrosis Tumoral (TNFR) incluyendo a la superfamilia FAS y TRAIL, la activación de estos receptores de muerte conduce a la activación de las caspasas iniciadoras como la 8 y 10. Este proceso implica la formación de un complejo de señalización denominado DISC, que a su vez activa a la caspasa efectora 3 que es la responsable de la escisión de los llamados sustratos de muerte, incluyendo la fragmentación de ADN, nuclear y membranal, entre otros cambios morfológicos y bioquímicos. Aunque estudios recientes sugieren una mayor complejidad en la vía extrínseca ya que se puede ver implicada en la activación de la vía intrínseca, así como en sub-vías de la necrosis (Duprez *et al.*, 2007; Whelan *et al.*, 2010).

Los efectos citopáticos son todos aquellos cambios morfológicos en las células provocados por la infección viral. Las células infectadas algunas veces tienen alterada su membrana celular. La membrana de la célula infectada es capaz de fusionarse con una célula vecina, esta alteración es el resultado de la inserción, durante el ciclo de replicación, de proteínas virales. Como consecuencias de la fusión se genera una célula multinucleada o sincitios. Existen alteraciones en la permeabilidad de la membrana, permitiendo la entrada de varios iones o toxinas. Estas células multinucleadas son grandes, por lo que algunas veces son llamadas células multinucleadas gigantes (Orraca *et al.*, 2011).

### **2.3 CLASIFICACIÓN**

Los virus son clasificados por el sistema Baltimore de acuerdo a su genoma y el Comité Internacional de Taxonomía Viral, los clasifica según su esquema taxonómico universal que asigna a los virus: orden, familia, sub-familia, género y especie. Todos los virus que pertenecen a la misma familia deben tener la misma clasificación Baltimore (Chenlong *et al.*, 2012; ICTV, 2012).

Baltimore clasifica a los virus en seis grupos: clase I que consiste en virus ADN bicatenario, clase II virus ADN monocatenario sentido positivo, clase III ARN bicatenario, clase IV ARN monocatenario sentido positivo, clase V ARN monocatenario sentido negativo, clase VI virus ARN monocatenario retrotranscrito y clase VII virus ADN bicatenario retrotranscrito (Baltimore, 1971 citado en Chenlong *et al.*, 2012).

Los retrovirus se caracterizan por romper el dogma central de la biología molecular que postula que del ADN se forma el ARN y posteriormente a proteínas. El material genético de los retrovirus es ARN que en el ciclo de replicación viral origina un intermediario de ADN. La enzima polimerasa causante de este paso se denomina transcriptasa reversa. El ADN proviral se integra en las células

infectadas y a partir de ese momento se replica en conjunto con el resto del genoma celular, son un ejemplo de virus clase VI (Soriano y Treviño, 2010).

La replicación de Hepadnavirus requiere la síntesis de un ADN circular cerrado de modo covalente. La formación de este ADN, podría requerir actividades enzimáticas de la transcriptasa inversa (RT). La RT cataliza una reacción de escisión-ligadura que conduce a la formación de una cadena de longitud menor al ADN circular cerrado y su posterior unión a una cadena plus de ADN, pertenecen al grupo VII de la clasificación Baltimore (Sohn *et al.*, 2008).

### **2.3.1 VIRUS ARN**

Hoy en día la mayoría de los virus que infectan a animales y plantas son virus de genoma ARN, existen diversos tipos: de cadena doble, sencilla ya sea de polaridad positiva o negativa. Los virus de ARN tienen genomas pequeños que rara vez exceden los 30 Kb de tamaño y gran parte se utiliza para codificar las proteínas implicadas en la replicación del ARN viral. La síntesis del ARN viral es catalizada por ARN polimerasa que es dependiente del ARN codificado por el virus (Tao *et al.*, 2010).

Su genoma codifica proteínas virales, secuencias y estructuras reguladoras. En algunos virus, las regiones distantes del genoma de ARN pueden interactuar entre sí a través de pares de bases, lo que sugiere que algunos genomas puedan adoptar configuraciones bien definidas (Wu *et al.*, 2013).

Los virus ARN de polaridad negativa tienen el genoma cubierto de una proteína de forma helicoidal conocida como: Complejo Ribonucleoproteico (RNP) que funciona como una plantilla única para la replicación viral y la transcripción. El ARN viral recién sintetizado y la replicación intermedia se empaquetan como RNA

polimerasa y se estabilizan en forma de cadena simple inmediatamente después de su síntesis (Tao *et al.*, 2010).

## **2.4 VIRUS ARN MONOCATENARIOS POLARIDAD POSITIVA**

Los virus ARN de polaridad positiva son un grupo muy exitoso de patógenos, que a pesar de la adaptación a diversos huéspedes, los procesos básicos de expresión y replicación del genoma son altamente conservados en estos virus. De las características que comparten es la asociación de la maquinaria de replicación del ARN con las membranas celulares. Se ha propuesto que el montaje de complejos de replicación en las membranas puede facilitar la infección de diversas maneras: una de ellas es aumentando la concentración de proteínas virales, las cuales proporcionan andamiaje estructural para el montaje de proteínas de replicación y ocultando intermediarios de la replicación viral ARN de doble cadena, a partir de los mecanismos de inmunidad innata celular (Nchoutmboube *et al.*, 2013).

Todos los virus ARN de cadena positiva replican sus genomas en asociación con reordenamientos de membranas tales como vesículas intracelulares de acción simple o de doble membrana. Sin embargo, los sitios exactos de la síntesis de ARN y las relaciones entre membranas no están bien definidas (Kopek *et al.*, 2007).

Estos genomas víricos actúan como ARNs mensajeros y ellos mismos son traducidos inmediatamente tras la infección de la célula hospedera. Los virus de esta clase pueden subdividirse en dos grupos:

- 1.-Producción de una poliproteína comprendiendo la totalidad de la información genética del virus, que posteriormente es dirigida por proteasas para producir precursores y polipéptidos maduros; estas digestiones pueden ser una forma de regular la expresión de la información genética. Digestiones alternativas dan como

resultado la producción de varias proteínas con propiedades diferentes a partir de un mismo precursor.

2.-Producción de ARN mensajero subgenómico, resultando dos o más rondas de traducción del genoma: esta estrategia es empleada para lograr una separación temporal de lo que son esencialmente fases precoz y tardía de la replicación, en la que se producen proteínas no estructurales, incluida una replicación viral durante la fase precoz seguida de proteínas estructurales en la fase tardía. Las proteínas producidas en cada una de las dos fases pueden resultar del procesamiento proteolítico de una poliproteína precursora, aunque esta comprende solo parte del genoma viral en vez del genoma entero. El procesamiento proteolítico ofrece más oportunidades para la regulación de la proporción de los distintos polipéptidos producidos en cada fase de replicación. Además de la proteólisis los virus emplean otras estrategias para producir polipéptidos alternativos de un ARN mensajero subgenómico, bien por lectura de codón de paro de la traducción permeable o por un desplazamiento deliberado de la pauta de lectura ribosomal en un ciclo concreto (Cann, 2005).

Para algunos virus ARN de polaridad positiva, la replicación requiere de enzimas virales como helicasa, RNA polimerasa y proteínas no enzimáticas que participan en el ensamblaje del complejo de replicación viral. Proteínas de la célula huésped a menudo desempeñan un papel esencial en la replicación de estos virus (Tao *et al.*, 2010).

## **2.5 NOROVIRUS**

Norovirus se clasifica dentro de la familia *Caliciviridae*, es un virus de tipo RNA cadena sencilla en sentido positivo, es poliadenilado y cuenta con 3 marcos de lectura abierta denominados: ORF 1, ORF 2 y ORF 3. (Green *et al.*, 2013).

Los Calicivirus se clasifican en cuatro géneros: Vesivirus causal del exantema vesicular porcino, Lagovirus asociado a la enfermedad hemorrágica de los conejos y síndrome de la liebre marrón europea, Norovirus y Sapovirus, relacionados con diarrea (Berke *et al.*, 1997; Green *et al.*, 2000).

Es genéticamente diverso, existen 35 genotipos, clasificados en cinco genogrupos (GI-GV), basados en proteínas de la cápside y genes de la polimerasa. 14 genotipos en GI, 17 genotipos en GII, 2 genotipos en GIII, 1 en GIV y 1 en GV (Hoffman *et al.*, 2010).

Las cepas que infectan a los humanos se clasifican en GI, GII y GIV. Norovirus porcino se encuentra en GII, bovino y ovino GIII, Norovirus murino se agrupa en GV (Wang *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005). Los caninos pertenecen al genogrupo GIV según Martella *et al.*, (2008), aunque existen reportes que los perros se ubican en un nuevo genogrupo denominado GVI y es zoonótico, (Mesquita *et al.*, 2010).

Existen cepas de carácter zoonótico y antropozoonótico. La cepa de bovinos y de cerdos, es un ejemplo de ello (Widdowson *et al.*, 2005; Farkas *et al.*, 2005).

### **2.5.1 GENOMA**

Se conforma por 3 marcos de lectura abierta (Green *et al.*, 2013). El orden de codificación para ORF 1 está estructurado con, p48, NTPasa, p22, VPg, 3CLpro y RdRp. ORF2 codifica para proteínas mayor de la cápside y ORF3 para proteínas menor de la cápside (Hardy, 2005).

ORF 2: En este marco de lectura se localiza VP1, mide de 530 a 555 aminoácidos y está dispuesto en 180 copias para formar un virión icosaédrico (Prasad *et al.*, 1999; citado en Vongpunsawad *et al.*, 2013). Es denominada proteína mayor de la cápside, brindando a Norovirus su extensa diversidad genética. Los dominios que

lo conforman, funcionan como anclaje a las células y las secuencias de estos dominios pueden activar anticuerpos neutralizantes, consiguiendo protección ante la respuesta inmune (Lochridge *et al.*, 2005).

Conformado por dos dominios: dominio S que forma una capa alrededor del ARN, que estructura parte del icosaedro, funcionando en el ensamblaje de la cápside y P es el dominio que sobresale, teniendo interacción con el huésped. A su vez P se divide en dos subdominios P1 y P2. El dominio P1 corresponde a la parte posterior y P2 a la parte superior del arco del capsómero, esta ubicación le confiere a P2 secuencias variables e importancia en la vinculación con el sistema inmune y receptores de interacción (Prasad *et al.*, 1999; citado en Beier, 2014; Tan *et al.*, 2005).

Recientemente un estudio realizado por Subba-Ready *et al.*, (2012), demuestran que VP1 interactúa directamente con ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), a través de su dominio S que exhibe un regulador dependiente de la traducción y síntesis de ARN, sugiriendo que después de que el virus entra a las células y ocurre el desmontaje de la cápside, VP1 se libera aumentando la actividad de RdRp continuando su efecto durante el ciclo de replicación. Posteriormente VP1 en su última instancia alcanza un umbral para la oligomerización, la reducción gradual de la señalización en la replicación viral, inicio del montaje y encapsidación del genoma. Varias regiones del subdominio S se ven implicadas con RdRP y por ende tienen vínculo entre VP1 Y VP2, en esta interacción también se obtiene estabilidad que resulta en la iniciación de la fase de montaje durante la replicación de Norovirus.

ORF 3: Conformado por la proteína menor de la cápside denominada VP2, mide de 208 a 268 aminoácidos. Su función es el ensamblaje de la cápside y encapsidación del genoma. Sea demostrado que se une a los dímeros de VP1 y le brinda estabilidad (Bertolitti *et al.*, 2003). La expresión de VP2 es relativa a VP1 y

se encuentra más ligada a la producción de partículas (Luttermann y Meyers., 2007).

Se ha demostrado que el dominio P de VP1, no tiene efectos significativos sobre VP2, en cambio al estudiar a su dominio S puede estar implicado en su expresión y solo el dominio S de VP1 es necesario para interactuar con VP2, incluso con la interacción de solo el dominio S, VP2 puede ensamblar el icosaedro (Vongpunsawad *et al.*, 2013).

ORF 1: La región ORF 1 de Norovirus es una gran poliproteína que mide aproximadamente 1789 aminoácidos. Pre y post-traducción es escindida por la proteasa NS6 codificada por el mismo virus, para liberar al menos seis proteínas maduras no estructurales: p48, NTPasa, p22, VPg, 3CLpro y RdRp, incluyendo a N56 (Sosnovtsev *et al.*, 2006).

P48: consta de 398 aminoácidos en N-terminal. Esta proteína no posee secuencia similar a otra proteína viral ni celular, aunque su función se puede asociar al ciclo de replicación. Se localiza en vesículas intracelulares, transitoriamente cuando se expresan como proteínas de fusión (Hughes y Stanway, 2000; Ettayebi y Hardy, 2003).

Cuando p48 se fusiona, interactúa con SNARE que es un regulador de VAP-P (Proteínas de membrana asociadas a vesículas asociadas a proteínas A) con el fin de regular el acoplamiento y fusión del virus. En la replicación de virus RNA que se lleva a cabo en la membrana intracelular p48 coordina la localización, con el fin de expresar VAP-P y anclar la membrana unida a complejos de replicación. Es decir VAP-P y p48 se comportan como proteínas de andamiaje, para el ensamblaje del complejo de replicación (Ettayebi y Hardy, 2003)

NTPasa: Es clasificada como una RNA helicasa (super familia tres), porque se conforma por tres motivos específicos A, B y C. Se une a ATP y la hidroliza,

aunque no sea demostrado claramente su actividad de helicasa (Pfister y Wimmer, 2000; citado en Hardy, 2005).

P22: su función es proteolítica, está implicada en la inducción del desmontaje del aparato de Golgi e inhibición de la secreción de la proteína celular. P22 cuenta con un motivo YXWESDG que emite una señal de exportación al retículo endoplásmico (RE) di-ácido, lo que resulta en una inhibición del tráfico normal a las vesículas y desmontaje de Golgi. Normalmente ocurriría que las señales de exportación del retículo endoplasmático es aprovechada por un subconjunto de proteínas para salir del RE por absorción directa en vesículas COPII, para su transporte al aparato de Golgi (Sharp *et al.*, 2010).

VPg: Denominada proteína viral genómica, mide 133 aminoácidos y vincula al ARN viral. VPg se adjunta como proteína cebador a 5 terminal de los RNAs genómicos, lo que conduce al inicio de la replicación del genoma. También se ha demostrado que interactúa con la unidad ribosomal 40 s (Rohayem *et al.*, 2006).

3CLpro: es una proteasa que tiene pliegues de quimi tripsina y dos dominios en N-terminal: dominio  $\beta$ -hoja anti-paralelo retorcido y dominio  $\beta$ -barril en C-terminal, además de un residuo de cisteína como nucleófilo (Zeitler *et al.*, 2006). Su función es escindir la poliproteína madura y proteínas virales intermedias. Dicha proteasa ha sido objeto de estudio para el desarrollo de antivirales inhibidores de dipeptidil a base de disulfito entre otros (Kim *et al.*, 2012).

RdRP: RNA polimerasa dependiente de RNA. Su función esta prevista en la replicación del genoma, síntesis y amplificación de ARN subgenómico adicional RdRp se une a 3CLpro convirtiéndose en una proteína bi-funcional, entre proteasa y polimerasa (Mastrangelo *et al.*, 2012).

## 2.5.2 MECANISMOS DE REPLICACIÓN E INFECCIÓN

El primer evento involucrado en la replicación, se regula por la interacción entre la superficie celular del huésped y proteínas virales. Involucra estructuras de hidratos de carbono y colesterol, que en el caso de Norovirus incluyen antígenos de los grupos HGBA, particularmente de los trisacáridos denominados antígenos H tipo 2 presentes en eritrocitos y enterocitos en humanos. Otros antígenos como el tipo 1,3 y Lewis se encuentran en células epiteliales del intestino, mediando la interacción de VLPs de otros Norovirus y permiten su internalización a la célula (Lindesmith *et al.*, 2008).

El dominio de unión de Norovirus ha sido localizado, en el subdominio P2 de la proteína de la cápside, puede reconocer antígenos del grupo HGBA y sus receptores (Tan *et al.*, 2003).

Cuando el virus logra penetrar a la célula, su liberación puede ser dependiente de clatrina (proteína que su función principal es recubrir las vesículas en el proceso de transporte de membrana) formada en la membrana plasmática, que por acción de la GTPasa dynamain II, vacía su contenido en los endosomas tempranos (Corner y Schmid, 2003; citado en Perry y Gobus, 2010). La acidificación del endosoma es necesaria para la liberación del genoma de Norovirus al interior del citoplasma del huésped. Sin embargo pueden utilizar otras vías independientes que son ricas en colesterol (Perry *et al.*, 2009).

VPg interactúa con los componentes del factor de iniciación de la traducción eIF4 y eIF33, funge como proteína Cap y a su vez se relaciona con la subunidad 43s del ribosoma (Chaudry *et al.*, 2006).

La traducción de las proteínas virales VP1 y VP2, se crean a partir del ARN subgenómico. Como estrategia viral se producen altos niveles de VP1 para el ensamblaje, se forma el icosaedro conformado por 180 copias de VP1 dispuesto

en 90 dímeros. El ARN subgenómico es elevado en células infectadas (Prasad *et al.*, 1994; citado en Thorne y Goodfellow, 2014).

Al término de la traducción de VP1 inicia la traducción VP2. Es un mecanismo de terminación y reinicio, debido a que el ARN subgenómico que lo conforma es policistrónico. El codón de inicio de VP2 (AUG), se superpone al codón de parada de VP1 (UAA) que va río arriba, en el pentanucleótido UAAG (Naphtine *et al.*, 2009).

La traducción de la poliproteína que conforma a ORF 1 es seguido durante y después de la traducción por la proteasa viral NS6 que da como resultado la liberación de proteínas listas para la formación de complejos. Recientemente en un estudio *in vitro* de Norovirus se ha descubierto que NS6 se une en su extremo C terminal dentro de la hendidura de unión al péptido de una molécula vecina, lo que lo conforma como un péptido proteasa confiriéndole diversas funciones. De igual manera dicho descubrimiento da un panorama distinto y permite estudiar mejor la interacción de NS6 y NS7 (Leen *et al.*, 2012).

La replicación de Norovirus se produce en una estrecha relación con complejos virales y derivados de la membrana citoplasmática (Belov y Kuppeveld, 2012 y Wobbus *et al.*, 2004). Las proteínas NS, así como de la cápside mayor y menor, forman el complejo de replicación (Thorne *et al.*, 2012).

Norovirus puede utilizar la red del citoesqueleto para posicionar el complejo en principios de la infección. Este proceso es mediado entre VP1 y tubulina acetilada (Hyde *et al.*, 2012).

Las organelos de replicación viral son retículo endoplasmático (RE), red trans de Golgi y endosomas (Hyde y Mackenzie, 2010). p22 contiene una señal de exportación para el retículo endoplasmático, promoviendo su incorporación de vesículas COPII y se transporte del RE al aparato de Golgi. p22 se ve involucrado

de igual forma en el desmontaje de Golgi y proteínas de secreción. p48 actúa como p22 en una vía alterna (Ettayabi y Hardy, 2003; Sharp *et al.*, 2010).

Norovirus al tener un RNA en sentido positivo, la replicación del genoma se produce a través de un RNA en sentido negativo y es realizado por el RdRp viral (Hogbom *et al.*, 2009).

Un estudio reciente Subba-Ready *et al.*, (2012), propone que la iniciación de Novo-RdRp se utiliza para la síntesis de ARN en sentido negativo y subgenómico, a partir de la interacción con VP1 y es dependiente a la concentración.

En el caso de que la vía sea por VPg-RdRp, inicia la síntesis de ARN por una unión covalente de VPg a través de un enlace fosfodiéster. El nucleótido iniciador de la familia *Calciviridae* es guanina, a este proceso se le llama: guanilación. Esta plantilla es la que inicia la síntesis de ARN. La vinculación es esencial para la infectividad, así como la remoción oportuna de VPg por que posteriormente reduce la infectividad (Subba-Ready *et al.*, 2011).

Según Belliot *et al.*, (2005), algunos RNA's virales compiten con los RNA mensajeros (RNAm) celulares para poder ser traducidos o inhiben simultáneamente la traducción de los ARNm.

Finalmente Norovirus induce la apoptosis, no sin antes procesar NS 1 y 2 durante la última etapa del ciclo viral. La inducción se asocia con un regulador de supervivencia, seguido por la activación de caspasas, catepsina B y citocromo C (Bok *et al.*, 2009).

### **2.5.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE NOROVIRUS**

Se realiza en base a la técnica de RT-PCR, mediante la extracción del material genético según Mesquita *et al.*, (2010) en un estudio realizado en perros. En el

primer reporte realizado en cerdos realizaron extracción a base de Trizol, posteriormente técnica de RT-PCR y utilización de plásmidos para su posterior inoculación en Baculovirus y purificación (Farkas *et al.*, 2005). En bovinos y ovinos se realizó la extracción, elaboración de cDNA, técnica de PCR, purificación y secuenciación del genoma (Otto *et al.*, 2011).

## **2.6 ASTROVIRUS**

Astrovirus forman una familia pequeña de virus ARN, icosaédricos, que miden aproximadamente de 28 a 30 nm e infectan a una gran variedad de mamíferos y aves. La familia *Astroviridae* consiste en dos géneros: *Mamastrovirus* para mamíferos y *Avastrovirus* para aves. Se han descrito infecciones esporádicas por Astrovirus, así como a gran escala en poblaciones susceptibles. En animales causa gastroenteritis y en aves enfermedades entéricas y extraintestinales. Fue identificado por primera vez en humanos en muestras de heces en 1975, después de haber sido observados en micrografías electrónicas recibieron ese nombre porque poseen forma de estrella (Stenglein *et al.*, 2012; Walter y Mitchell, 2003 citado en Dong *et al.*, 2011).

### **2.6.1 CARACTERÍSTICAS**

Astrovirus son virus sin envoltura, su replicación se lleva a cabo en los enterocitos de tractos intestinales de los organismos infectados (Mosser y Shultz, 2005).

Se han realizado análisis genéticos y se ha identificado en 22 especies, entre ellas: murciélago (Chen *et al.*, 2009), felino (Moschidou *et al.*, 2011), canino (Martella *et al.*, 2011), pavo y ovino (Jonnsen *et al.*, 2013), bovinos con signología entérica y nerviosa (Bouzas *et al.*, 2014; Alfred *et al.*, 2015), porcinos de igual forma que los bovinos en presencia con cuadros neurológicos (Blomström *et al.*, 2014) y conejos (Martella *et al.*, 2011) logrando su clasificación.

Según Bosh *et al.*, (2014) en humanos se conocen 8 serotipos diferentes de Astrovirus (AstVH 1-8), representando del 2 al 9% de casos de gastroenteritis aguda de origen vírico a nivel mundial. Astrovirus muestra una alta diversidad genética y por lo tanto un gran potencial zoonótico.

En bovinos se han reportado dos serotipos (BoAstV 1 y 2) (Alfred *et al.*, 2015), en caninos (CaAstv) se han descrito cuatro cepas aun no caracterizadas, aunque recientemente se realizó la secuenciación del genoma completo de dos de las cuatro cepas (Cady y Goodfellow, 2015), en aves se han caracterizado dos cepas Virus de la nefritis aviar y Astrovirus en pollos (CAstV) causante del retraso de crecimiento de pollos por causar nefritis intersticial (Baxendale, 2004 citado en Oladimeji *et al.*, 2012) y en conejos se cuenta con la secuencia del genoma completo de Astrovirus (Stenglein *et al.*, 2012).

### **2.6.2 GENOMA**

La cepa HAstV-1 es el miembro más estudiado de la familia *Astroviridae* y es utilizado para describir la biología molecular de Astrovirus. Son virus sin envoltura y de genoma ARN, con una sola cadena en sentido positivo de 6.8 a 7.2 K.b de longitud, encapsulados de la nucleocápside, se han identificado tres marcos de lectura abiertos: ORF1a y 1b situados en el extremo 5' del genoma que codifica para proteínas no estructurales y proteínas de la polimerasa respectivamente, mientras que ORF2 ubicado en el extremo 3' codifica para proteínas de la cápside. ORF1b expresa una fusión de proteínas generada a través de un mecanismo de desplazamiento de marco ribosómico usando una secuencia resbaladiza altamente conservada entre ORF 1a y 1b. Esta secuencia es una región de 70 nucleótidos entre ORF1a y 1b, se encuentra río abajo y se caracteriza por la formación de un loop que contiene la señal del cambio de marco traduccional (Krishna, 2005; Masroor *et al.*, 2013).

Región ORF 2: Codifica para VP90 que representa un polipéptido precursor de la cápside. Está conformado por tres dominios: Amino-terminal, C-terminal y dominio intermedio hipervariable. La región Amino-terminal es una región altamente conservada que tiene contacto con el ARN del virión y es indispensable para el montaje de la cápside, la región Carboxi-terminal tiene un carácter ácido y sustrato para las caspasas celulares, el dominio intermedio hipervariable que conforma los picos del virión, además es el dominio que tiene las primeras interacciones con la célula (Lara y Méndez, 2010; Méndez *et al.*, 2014).

Las caspasas son proteasas-cisteína específicas para los residuos de ácido aspártico, que juegan un papel clave en la apoptosis. Pueden ser activadas por proteólisis o estímulos incluyendo ligandos a receptores de muerte y fármacos citotóxicos. La actividad de las caspasas se ha relacionado con la liberación de astrovirus y con la maduración de VP90 a VP70 proceso que se da intracelularmente, sin embargo no es necesario para el montaje de partículas virales (Schulze *et al.*, 1998 citado en Lara y Méndez, 2010).

Posteriormente VP70 será escindido por tripsina y será procesado en el residuo 393 de arginina, para producir polipéptidos VP41 y VP28. Estas proteínas son escindidas en su región carboxi y amino terminal, para producir sus productos finales: VP34 derivada de VP41 y de VP28 resultan VP27 y VP25 (Méndez *et al.*, 2007).

VP34 se deriva de la región N-terminal altamente conservada, mientras que VP25-27 y VP29, pertenecen a la región hipervariable y se sugiere que están relacionados con la neutralización del virus y la unión del virus a la célula diana (Dong *et al.*, 2011).

ORF 1a y ORF 1b: codifican dos poliproteínas no estructurales nsp1a y nsp 1ab, que son sintetizadas través de un mecanismo de cambio de marco traduccional y procesadas por viral 3C-like serina proteasa y RNA polimerasa dependiente de

RNA respectivamente, siendo las encargadas de la replicación del genoma viral (Lewis y Matsui, 1996; citado en Dong *et al.*, 2011). Las proteínas no estructurales (NSP) se traducen a partir del ARN genómico. Tras la infección, las proteínas no estructurales participan en la transcripción de una cadena negativa de ARN de longitud completa, que sirve como la plantilla para la transcripción de nuevos RNAs genómicos y subgenómicos. Grandes cantidades de proteínas estructurales se pueden sintetizar a partir del ARN subgenómico poliadenilado que contiene la información completa de ORF2 (Guix *et al.*, 2004).

### **2.6.3 DIVERSIDAD**

Astrovirus comprenden 2 géneros: Mamastrovirus y Avastrovirus, que pueden infectar especies de mamíferos y aves respectivamente. En pollos de 2 a 6 semanas de edad, este virus es considerado como el primer causal de origen vírico de diarrea y otras patologías extraintestinales, dando origen a índices de mortalidad de hasta el 40% en la producciones (Shah *et al.*, 2016). En terneros el panorama es similar al de las aves teniendo en primer lugar a las enfermedades del tracto digestivo como causa de mortalidad, seguido de problemas respiratorios. Se ha descrito que en la mayoría de los casos son infecciones de tipo: bacteriana, parasitaria y viral, actuando en sinergia (FAO, 2010). Sin embargo para el caso de Astrovirus en bovinos, independiente a la signología entérica que desarrolla, se ha visto implicado en daños al Sistema Nervioso Central por la cepa BoAstV-NeuroS1 (Li *et al.*, 2013).

Estudios en ovinos y conejos son escasos. Para esta especie se ha descrito su presencia en granjas con altas tasas de mortalidad que oscila entre el 90% del total de la población y solo se conoce la secuencia de su genoma (Stenglein *et al.*, 2012). En caninos toma importancia porque no existe control y enfermedades víricas ocasionan altos niveles de mortandad en los primeros meses de vida.

La taxonomía de Astrovirus se basa principalmente en la especie de origen y serotipos dentro de cada especie que son definidos sobre la base de los títulos de neutralización cruzada. La mala adaptación de Astrovirus a sistemas de laboratorio llevo al estudio del genoma basado en su clasificación en un porcentaje similar de nucleótidos y aminoácidos secuenciados de ORF-2 en la cápside proteica. En humanos se conocen ocho serotipos del HAstV1 al V8, aunque recientemente se han identificado 5 nuevas especies AstV MLB 1 y 2, AstV-VA1, AstV-HMO-A y AstV-HMO-B (Masroor *et al.*, 2013).

La clasificación de los Mamastrovirus (MAstV) es dada del 1 al 19, conformada por: MAstV1 para humanos, 2 felinos, 3 porcinos, 4 león marino californiano, 5 caninos, 6 humanos, 7 delfín nariz de botella, 8 y 9 humanos, 10 visón, 11 león marino californiano, 12 murciélagos, 13 ovinos y del 14 al 19 murciélagos (ICTV, 2015).

Los Mamastrovirus tienen genoma ARN compuesto de una sola cadena en sentido positivo que codifica tres marcos de lectura abiertos: ORF1a, 1b y 2. Entre el marco 1a y 1b permite codificar proteasas y un ARN polimerasa dependiente y ORF 2 codifica proteínas de la cápside viral. La clonación de ORF 2 en vectores ha permitido el montaje in vitro de partículas similares al virus (Rivera *et al.*, 2010). Recientemente se ha descrito una nueva propuesta de género para la familia *Astroviridae*, denominada: Bastrovirus, como respuesta a los nuevos reportes de este virus, a las secuencias que pertenecen a dicha familia que no tienen clasificación y a las cepas con potencial zoonótico. Aunque tiene características similares difiere en tamaño, es menor a lo habitual de 6.3 Kb, muestra porcentajes de identidad del 67% al 93%, sin embargo comparte homología con los miembros de la familia *Hepeviridae*, en un 28% en proteínas no estructurales y se ha determinado su existencia en pacientes inmunodeprimidos. La existencia de este nuevo género puede ser resultado de eventos de zoonosis (Munninck *et al.*, 2016).

La familia *Astroviridae*, presenta un gran potencial zoonótico, por lo que surgen los grupos: HAstV-MLB y HAstV-VA / HMO, que son cepas de humanos muy similares a las de animales. Se han localizado en tracto digestivo y sistema nervioso (Bosh *et al.*, 2014). Prueba de ello es la cepa BoAstV-NeuroS1 que afecta a los bovinos y guarda estrecha similitud con las cepas AstV-HMO-C y HAstV-VA1 del tejido cerebral de un paciente de 15 años con encefalitis (Li *et al.*, 2013). Por lo que es de suma importancia obtener conocimiento sobre su conformación y biología, con el fin de prevenir futuros problemas de salud pública.

Astrovirus también presenta una alta diversidad, que es resultado de la alta tasa de error en la transcripción debido a que no contiene puntos de control, que detecten errores en la secuencia, por lo que no permite corregirla y se sintetiza por completo, lo mismo que pasa con Norovirus (Arias *et al.*, 2016). Lo que se traduce en un alto porcentaje de mutaciones y da origen al estudio constante de todas las variables emergentes de Astrovirus y supervisar su potencial zoonótico, ya que tampoco existe vacuna alguna como medio de prevención.

#### **2.6.4 REPLICACIÓN**

El esquema de replicación, transcripción y traducción que se ha postulado para Astrovirus es parecido a los de Alfavirus y a los Calicivirus, las cuales presentan una organización genómica y una estrategia de síntesis de proteína estructurales a partir de un ARN genómico y una estrategia de síntesis de proteínas estructurales a partir de un de ARN subgenómico similar a las de Astrovirus. Tras la entrada del virus a la célula hospedera tendrá lugar la síntesis de proteínas no estructurales a través del genoma, estas proteínas transcribirán la cadena negativa completa, la cual a su vez servirá de molde para la síntesis tanto de nuevas moléculas genómicas como moléculas de ARN subgenómico de polaridad positiva, aunque todavía no está demostrado científicamente parece ser que existe un promotor para el ARN subgenómico que solo será funcional en las cadenas negativas de ARN. Finalmente tendrá lugar la síntesis de proteína a gran

escala al traducirse el ARN subgenómico; de este modo la presencia de proteínas de la cápside es indicativa de que la replicación del genoma ya haya tenido lugar (Guix, 2003).

La proteína de la cápside de astrovirus desempeña un papel único en la patogénesis de la diarrea: la proteína de la cápside interactúa con las membranas apicales de los enterocitos, aumentando la permeabilidad, favoreciendo la replicación del virus (Rivera *et al.*, 2010).

### **2.6.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ASTROVIRUS EN CONEJOS**

El primer estudio realizado para Astrovirus en conejos fue realizado por Martella *et al.*, (2011) en Italia, donde se obtuvieron varios grupos de animales en total 23 conformados por 2-5 animales cada uno, tenían edades de 35-55 días, extrayendo porciones de intestino delgado y grueso con contenido intestinal de conejos con enteritis. Las muestras fueron almacenadas a -80 grados Celsius. Realizaron la extracción de ADN y detección de Astrovirus por el método RT-PCR, se prepararon extractos de ARN homogenizados al 10% en una solución salina tamponada con fosfato, de pH 7.3 y después se clarificó por centrifugación a 10,000 rpm. El ARN vírico se extrajo utilizando un kit de ARN viral QIAamp; las muestras de colección se seleccionaron inicialmente para colocarlas en un par de cebadores dirigidos a la región ORF 1b, la selección inicial mostró amplicones de PCR del tamaño esperado de 409 pares de bases. Las secuencias de ORF 1b generados con los cebadores AstV, se utilizaron para diseñar conjuntos de cebadores más específicos y sondas para PCR de transcripción inversa y PCR en tiempo real cuantitativa capaz de identificar y cuantificar los Astrovirus de conejo. Los cebadores y sondas Taqman son diseñados utilizando software Beacon Design versión 2.0. La PCR en tiempo real logró un amplicón ORF1b de tamaño de 409 pb que fue clonado en PCR4-topo vector y se transcribió *in vitro*.

El segundo estudio que existe a nivel mundial en conejos fue reportado un año después por Stenglein *et al.*, (2012), con el genoma completo para esta especie en Estados Unidos, Tennessee. Obtuvo muestras de una granja con índices de mortalidad del 90% en conejos con diarrea, aunque debe considerarse que encontró una carga alta de coccidias. Por microscopia electrónica, detectó lo que parecieran ser partículas virales de Astrovirus, lo que confirmó utilizando virochip's, PCR, secuenciación masiva y metagenómica. Se ocuparon un total 27 pares de primers dirigidos a cada una de las regiones. Al construir arboles filogenéticos demuestra relaciones con los AstV MLB, aves, ratones y bovinos.

### **2.6.6 RELACIÓN ASTROVIRUS-NOROVIRUS**

Astrovirus fueron descritos en el año de 1975, en muestras de diarrea de niños por microscopia electrónica y no siempre fue clasificado dentro de la familia *Astroviridae*. Tanto AstV y NoV, se encontraban descritos en un solo grupo denominado: small round-structured viruses (SRSV), en conjunto con otros virus causales de gastroenteritis. Fue hasta el año 1991, donde se describió que era un virus RNA monocatenario y en 1995 se confirmó mediante técnicas de biología molecular. Así mismo se realizó una comparación de proteínas y RNA, en células infectadas, dando reconocimiento a las familias *Caliciviridae* y *Picornaviridae* (Dedman *et al.*, 1998).

La especie en la que se ha estudiado mayormente la relación Astrovirus-Norovirus es en humanos. Independientemente de que ocasiona sintomatología similar que en este caso es la diarrea, comparten otras similitudes como su estructura, el genoma RNA monocatenario y que pueden ser traducidos directamente (Catriona *et al.*, 2007).

Según un estudio realizado por Kim *et al.*, (2015), sobre la relación de estos virus demuestra que las regiones codificantes para ambos virus muestran un alto parecido, así como sus factores reguladores de la transcripción y que

genéticamente pueden ser responsables de patologías en común. También propone que si el estudio de alguno de los virus es complejo, los hallazgos para Norovirus pueden dar un mejor entendimiento y utilizarse para Astrovirus.

Debido a estos reportes, se han creado propuestas de vacunas recombinantes que contienen proteínas de cápside para ambos virus, y en combinación con algunos otros como virus de hepatitis E o Rotavirus. La base de esta vacuna se encuentra en su genoma ya que son virus no envueltos, con proteínas dimericas que sobresalen de la cápside (P) y dentro de sus funciones se encuentran la neutralización anticuerpos, siendo una opción para el desarrollo de vacunas subunitarias, realizando la fusión de los 3 dominios P expuestos. Al estudiar los efectos post-vacunación se encontraron títulos neutralizantes altos para los virus y en el cultivo celular para NoV, una mayor actividad de bloqueo para sus receptores HBGA (Xia *et al.*, 2016).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción cunícola en México se ve afectada frecuentemente por tres tipos de patologías: neumonía, sarna y en mayor porcentaje problemas entéricos (Olivares *et al.*, 2009).

Norovirus se ha reportado en humanos como el primer causal de enfermedades entéricas de origen vírico a nivel mundial. La importancia de su estudio molecular radica en que presenta diversos genotipos y su capacidad de recombinación, así mismo el polimorfismo genético de sus receptores, que lo hace sumamente diverso. Su estudio en conejos no se ha reportado, aunque esta especie comparte algunas peculiaridades con las células epiteliales de humanos, sin embargo si existen los medios para concederse una infección y ser un importante agente causal de enteritis en conejos (Thorne y Goodfellow, 2014).

Astrovirus es un virus que se caracteriza por causar enfermedades en el tracto digestivo de los conejos, se ha presenciado en granjas con índices de mortalidad de hasta el 90% del total de su población, además de que se ha reportado que su presencia puede ser común. Existen escasos estudios en conejos, por lo cual no se conoce en su totalidad la diversidad genética o si existe relación interespecie. (Stenglein *et al.*, 2012).

No existen estudios de ambos virus en México, sería relevante su diagnóstico debido a que si llegan a estar presentes, podrían estar ocasionando altos índices de mortalidad debido a las severa signología entérica que pueden desarrollar en los animales y pérdidas económicas.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

A nivel nacional el Estado de México es la entidad líder en producción cunícola, con un inventario de 65 mil vientres y una producción aproximada de 54 mil 600 toneladas de carne de conejo. Los principales municipios productores pertenecen a la zona sur oriente como lo son: Amecameca y Tlalmanalco. (SAGARPA, 2015).

Es de importancia el estudio de Astrovirus en conejos, debido a que es un virus que ocasiona signología entérica como: diarrea, distensión abdominal e impactación cecal, que puede ocasionar la muerte de los animales y por ende pérdidas económicas a los productores. El diagnóstico de Astrovirus se ha basado en técnicas moleculares, debido a que es el método que ha logrado identificar de forma específica a los agentes virales y el cultivo celular es poco exitoso (Stenglein *et al.*, 2012).

Norovirus tiene afinidad a los grupos HGBA, particularmente a los trisacáridos denominados antígenos H tipo dos. Estos antígenos los podemos encontrar en células epiteliales del intestino de los conejos, por lo cual nos brinda un motivo suficiente para realizar su diagnóstico molecular ya que cuenta con las condiciones idóneas para su replicación y poder reportarlo (Abrantes *et al.*, 2012).

El uso de la técnica de RT-PCR en este estudio es debido a sus características de alta sensibilidad y especificidad, lo cual le confiere como ventaja detectar desde una sola copia viral (Pfitzner *et al.*, 2014).

Astrovirus no ha sido identificado en México y Norovirus no se ha estudiado en conejos, por tal motivo se realizara la identificación molecular para conocer su diversidad genética y realizar el primer reporte en lugar y especie.

## **5. HIPÓTESIS**

Norovirus genotipo GII.4 y Astrovirus, están presentes en conejos con cuadros entéricos, pertenecientes a la zona sur oriente del Estado de México.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 GENERAL**

Identificar por RT-PCR Norovirus y Astrovirus en conejos de la zona sur oriente del Estado de México.

### **6.2 ESPECÍFICOS**

- 1.- Amplificar la región ORF 1b de Astrovirus y ORF 1 de Norovirus.
- 2.-.Secuenciar los fragmentos amplificados.
- 3.- Realizar asociaciones de las secuencias encontradas en conejos de la zona sur oriente del Estado de México y compararlas con las reportadas a nivel mundial.

## **7. MATERIAL Y MÉTODO**

### **7.1 LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO**

El muestreo se realizó en el periodo comprendido del mes de agosto de 2015 a noviembre de 2016 en la zona sur oriente del Estado de México. El clima de la región es templado sub-húmedo con periodos de lluvia entre mayo y octubre. La temperatura media anual es de 14 °c y se encuentra a 2,420 metros a nivel del mar (INAFED, 2015).

### **7.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN**

El presente estudio es comparativo, observacional, no experimental y transversal.

### **7.3 POBLACIÓN BAJO ESTUDIO**

Se analizaron un total de 109 conejos pertenecientes a granjas cunícolas de la zona sur-oriente del Estado de México, siendo los municipios de estudio: Valle de Chalco, Chalco, Temamatla, Cocotitlan, Tlalmanalco, Juchitepec, Tenango del Aire, Ayapango, Amecameca, Atlautla, Ozumba, Tepetlixpa y Ecatzingo. Los criterios de inclusión establecidos fueron: edad de 35-65 días, que presenten cuadros entéricos y sin signología aparente. Los criterios de exclusión aquellos conejos que hayan sido medicados 7 días anteriores al muestreo.

### **7.4 TIPO DE MUESTREO**

No probabilístico, debido a que este tipo de muestreo puede ser utilizado cuando se quiere demostrar que existe un rasgo determinado en una población.

## **7.5 TOMA DE MUESTRAS**

Una vez seleccionados los conejos, se realizó la toma de muestras para proceder a su diagnóstico por biología molecular (RT-PCR).

### *Ante mortem*

Se colectaron muestras de 1 ml de heces líquidas o 2 gr de heces sólidas, según fuese el caso. Se depositaron en viales Eppendorf, los cuales fueron transportados en refrigeración al laboratorio, en donde se mantuvieron en congelación a -15 °c, hasta su análisis.

### *Post mortem*

Animales muertos dentro de un periodo no mayor a dos horas, animales sin signología aparente o conejos con cuadros entéricos que se sacrificaron de forma humanitaria (NOM-033-ZOO-1995), a los que se les practicó necropsia de acuerdo a lo descrito por De Aluja y Constantino, (2002). Dicho proceso se llevó a cabo en el anfiteatro del Centro Universitario UAEM Amecameca.

Las muestras colectadas fueron de contenido intestinal y porciones de intestino delgado. Todas las muestras se remitieron para su procesamiento y análisis en el Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética del C.U UAEM Amecameca.

## **7.6 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

La extracción del RNA viral se realizó con el kit GeneJET viral de ThermoScientific y la RT con el kit Improm II™ Reverse Transcription System (Promega) de acuerdo a instrucciones del fabricante.

Se estandarizaron las condiciones de la técnica de RT-PCR para la amplificación de la región ORF 1b de Astrovirus y ORF 1 de Norovirus.

## 8. DISCUSIÓN

Astrovirus fue identificado en conejos con cuadros entéricos, lo que coincide con lo reportado por Stenglein *et al.*, (2012), sin embargo no se obtuvieron muestras positivas en conejos sanos o sin signología aparente como lo describe Martella *et al.*, (2011). Es muy probable que la infección por Astrovirus en esta especie en México, refleje ser uno de los principales patógenos de origen vírico presentes en conejos con diarrea, a diferencia de otros virus determinados como primeros causales en otras especies, lo que se observó en este estudio con Norovirus.

Las infecciones por Astrovirus son esporádicas, así como a gran escala en poblaciones susceptibles (Walter y Mitchell, 2003), lo que ocurre de manera similar en conejos pertenecientes a granjas de la zona sur oriente del Estado de México. Bajo esta observación Norovirus presentó patrones similares a Astrovirus, en cuestión de presencia ya que solo se encontró en conejos con signología entérica y en poblaciones susceptibles.

En conejos Astrovirus es diferente, debido a que no presenta el dominio SRGHAE altamente conservado presente en la mayor parte de los miembros de esta familia, lo que se traduce en que pueda tener porcentajes de identidad bajos del 19.3% - 23.7% en relación con otros virus de mamíferos (Martella *et al.*, 2011). Los pavos carecen del mismo motivo y pudimos observar en el árbol filogenético construido para este virus que efectivamente las variantes de México guardan relación con los AstV de pavo tipo 1 y 2.

Los AstV MLB1 son descritos como ancestros y se ha demostrado su existencia a nivel mundial (Meyer *et al.*, 2015), y este estudio concuerda con ello, ya que el árbol construido, refleja como base a esta cepa viral.

El complejo entérico de los conejos se ha descrito como una infección multifactorial, asociada a diversos patógenos: virales, parasitarios y bacterianos,

donde pueden estar presentes todos o algunos en asociación ocasionando signología entérica en los animales (Percy *et al.*, 1993). Lo que en este estudio corroboramos ya que el 100% de las muestras positivas a Norovirus, fueron positivas a Astrovirus, encontrados en la misma muestra.

De acuerdo con lo descrito por Yan *et al.*, (2003), la combinación de Norovirus genotipo GII y Astrovirus es posible, lo que sugiere esta investigación.

## 9. CONCLUSIONES

Se identificó Astrovirus y Norovirus mediante la técnica de RT-PCR en conejos con signología entérica de la zona sur-oriente del Estado de México.

La cepa de Astrovirus en conejos de México, es diferente a las reportadas a nivel mundial, aunque si guarda relación, al igual que los AstV MLB1 por ser descrito como ancestro.

Norovirus se relaciona con el genotipo GII, que es el de mayor reporte a nivel mundial y GIV de humanos, caninos y felinos.

Ambos virus pueden estar presentes simultáneamente en conejos con signología entérica.

Este es el primer reporte de Astrovirus en México de esta especie y el primero de Norovirus a nivel mundial.

Es recomendable seguir con el estudio para la clasificación de las variantes de Astrovirus y Norovirus, mediante la amplificación de marcos abiertos de lectura ORF2, para ambos virus.

## 10. ARTICULO

### IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ASTROVIRUS EN CONEJOS DE MÉXICO

<sup>1</sup>LÓPEZ AGUADO A.G.\*, <sup>1</sup>BAUTISTA G.L.G., <sup>2</sup> MARTÍNEZ C.J.S., <sup>3</sup>ROMERO N.C.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca. Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, C.P. 50090, Estado de México, México.

<sup>3</sup>Clinica Veterinaria de Animales de Compañía CLIVAC. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México.

### RESUMÉN

Astrovirus es uno de los principales agentes etiológicos de origen vírico causal de diarrea en las diversas especies. En conejos su estudio ha sido sumamente limitado, y sólo se ha identificado en animales de Italia y Estados Unidos. En México no existen reportes de la presencia de Astrovirus en esta especie, por tal motivo el objetivo de este estudio fue identificar al virus empleando la técnica de RT-PCR, con lo que se amplificó parcialmente el marco de lectura abierto ORF1b, el resultado se confirmó realizando una PCR anidada. Del total de las muestras procesadas, se obtuvo que el 15 % presentaba este virus, lo que permitirá ser considerado en el diagnóstico de enfermedades entéricas.

**Palabras clave:** Astrovirus, RT-PCR, conejos, enteritis, México.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrantes, J., Loo, W., Pendu, J., Esteves, P., 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Veterinary Research*. 19 (1): 1.

Alfred, N., Liu, H., Li, L., Hong, F., Tang, B., Wei, Z., Chen, Y., Li, F., Zhong, Y., Huang, W., 2015. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of diverse bovine astroviruses associated with diarrhea in cattle and wáter buffalo calves in China. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 9 (1): 643.

Arias, A., Thorne, L., Ghurburrun, E., Bailey, D., Goodfellow, R., 2016. Norovirus polymerasa fidelity contributes to viral transmission *in vivo*. *The American Society for Microbiology*. 11 (1): 4-5.

Azhkenasi, A., Holland, P., Eckhardt, S., 2008. Ligand based targeting of apoptosis in cáncer: the potencial of recombinant human apoptosis ligand 2 tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *Journal Clinical Oncology*. 26 (1): 3621.

Baltimore, D., 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*. 6 (1): 236.

Baxendale, W., Mebatsion, T., 2004. The isolation and characteristion of Astrovirus in chickens. *Avian Pathology*. 6 (1): 364.

Beir, R., Pahlke, C., Quenzel, P., Henseleit, A., Boshke, E., Cuniberti, G., Labbude, D., 2014. Selection of DNA aptamer against norovirus capsid protein VP1. *Microbiology Letters*. 8 (1): 162.

Belliot, G., Sosnovtsev, S., Chang, K., Babu, V., Uche, U., Arnold, J., Cameron, C., Green, K., 2005. Norovirus proteinase polymerase and polymerase are both active forms of RNA dependent RNA polymerase. *Journal of virology*. 11 (1): 2393.

Belov, A., Kuppeveld, J., 2012. (+) RNA viruses rewire cellular pathways to build replication organelles. *Current Opinion in Virology*. 7 (1): 740.

Berke, T., Golding, B., Jiang, X., Cubitt, D., Woolfaardt, M., Smith, W., Matson, D., 1997. Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. *Journal of Medical Virology* 4 (2): 422-423.

Berkowitz, R., Fisher, J., Goff, S., 1996. RNA packaging. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 37 (1): 214.

Bertolotti, A., Crawford, S., Hutson, A., Estes, M., 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *Journal of Virology*. 13 (3): 11608-11609.

Blomström, L., Ley, C., Jacobson, M., 2014. Astrovirus as a possible cause of congenital tremor type All an piglets?. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 6 (3): 4-6.

Bok, K., Prikhodko, V., Green, K., Sosnovtsev, S., 2009. Apoptosis in murine norovirus infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. *Journal of virology*. 9 (1): 3650.

Bosh, A., Pintó, R., Guix, S., 2014. Human Astrovirus. *American Society for Microbiology Journals*. 27 (16): 1049-1065.

Bouzolas, Wüthrich, D., Walland, J., Drögemüller, C., Zurbriggen, A., Vandeveld, M., Oevermann, Bruggmann, R., Seuberlich, T., 2014. Neurotropic Astrovirus in

cattle with nonsuppurative encephalitis in Europe. *Journal of Clinical Microbiology*. 6 (1): 3318.

Cady, S., Goodfellow, I., 2015. Complete genome sequence of canine Astrovirus with molecular and epidemiological characterisation of UK strains. *Veterinary Microbiology*. 8 (2): 210-211.

Carter, G. *et al.*, (2005). *Virología veterinaria*. Estado Unidos, College of Veterinary Medicine, Virginia Tech. *IVIS*. 275 (10): 25-28, 50-53, 70-74.

Catriona, L., O'Leary, J., O'Sullivan., 2007. Real time reverse transcription PCR, detection of Norovirus, Sapovirus and Astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *Journal of Virology Methods*. 9 (3): 39-41.

Chan, W., Leung, T., Kwok, A., Lee, N., Chan, P., 2014. Characteristic of patients infected with Norovirus GII.4 Sydney 2012, Hong Kong, China. *Emerging Infectious Diseases*. 4 (1): 1.

Chaudry, Y., Nayak, A., Bordeleau, M., Tanaka, J., Pelletier, J., Belsham, G., Roberts, L., Goodfellow, I., 2006. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *Journal of Biological Chemistry*. 12 (1): 25315.

Chen, Z., Chu, D., Liu, W., Dong, B., Zhang, S., Zhang, J., Li, L., Vijaykrishna, D., Smith, J., Chen, H., Poon, L., Peiris, J., Gaun, YI., 2009. Detection of diverse astroviruses from bats in China. *Journal of General Virology*. 4 (1): 838.

Chenglong, Y., Hernandez, T., Zheng, H., Chung, S., Hsiung, H., Rong, L., Yang, J., Stephen, S., Yau, 2012. Real time classification of viruses in 12 dimensions. *PLOS one*. 10 (2): 1-2.

Chu, D., Ponn, L., Guan, Y., Peiris, J., 2008. Novel Astrovirus in insectivorous bats. *Journal of Virology*. 8 (2): 9107-9108.

Claverie, M., Ogata, H., Audic, S., Abergel, C., Suhre, K., Fournier, E., 2006. Mimivirus and the emerging concept of "giant" virus. *Virus Research*. 9 (1): 133.

Corner, S., Schmid, L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 8 (1): 37.

De Aluja, A., Constantino, F., (2002). *Técnicas de necropsia en animales domésticos*. 2 da. Edición. México, Editorial Manual Moderno. 110 (4): 26, 29-30,37.

Dedman, D., Laurichesse, H., Caul, O., Wall, G., 1998. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales 1900-1995. *Epidemiology and infection*. 10 (2): 130-131.

De Haan, C., Li, Z., Lintelo, E., Bosch, B., Haijema, B., Rottier, P., 2005. Murine Coronavirus with an extended host range uses heparan sulfate as an entry receptor. *Journal of virology*. 6 (2): 14451-14452.

Dong, J., Dong, L., Méndez, E., Tao, Y., 2011. Crystal structure of the human Astrovirus capsid spike. *PNAS*. 6 (1): 12681.

Duprez, L., Wirawan, E., Vanden, T., Vandenabeele, P., 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection* 3 (12): 1050-1051, 1059.

Dursyríska, J., Gózdicka, J., 2015. Viruses and cells intertwined since the dawn and evolution. *Virology Journal*. 10 (2): 7-8.

Elmore, S., 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicology Pathology*. 40 (2): 5-7.

Ettayebi, K., Hardy, Michel., 2003. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *Journal of Virology*. 8 (2): 11790,11793.

Farkas, T., Nakajima, S., Sugieda, M., Deng, X., Zhong, W., Jiang, X., 2005. Seroprevalence of noroviruses in swine. *Journal of Clinical Microbiology*. 5 (1): 657.

Fink, L., Cookson, T., 2005. Apoptosis, pyroptosis and necrosis: Mechanistic description of dead dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. 10 (1): 1907.

Forterre, P., 2006. Three RNA cells for ribosomal lineages and three DNA viruses to replicate their genomes: A hypothesis for the origin of cellular domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 6 (2): 3669, 3674.

Galluzi, L., Brenner, C., Morselli, E., Touat, Z., Kroemer, G., 2008. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathogens*. 16 (4): 14.

Gelderblom, R., 1996. Structure and classification of viruses. National Center for Biotechnology Information. (1): 1.

Gibbs, A., 2013. Viral taxonomy needs a spring clean; its exploration era is over. *Virology Journal*. 7 (1): 2.

Gomez, L., Henández, R., Bretón, J., 2013. A minimal representation of the self-assembly of virus capsids. Departamento de física fundamental II, Tenerife Spain. 6 (1): 1.

Green, K. Y., (2013) "*Caliciviridae: The Noroviruses*" en Knipe, D. y Howley, P. (ed.), *In fields virology*. Sexta edición. Filadelfia. 582-608.

Green, K., Ando, S., Balayan, T., Berke, N., Clarke, K., Estes, O., Matson, S., Nakata, D., Neill, J., Studernt, T., 1997. Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. *Journal of Medical Virology*. 52 (6): 419-424.

Groove, J., Marsh, M., 2011. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *Journal of Cell Biology*. 12 (2): 1071-1072.

Gutierrez, M., López, S., 2010. Mecanismos de entrada de virus: una manera de conocer la célula. *Revista Especializada en Ciencias Químicas Biológicas*. 9 (2): 27-28.

Guix, S., 2003. *La proteína nsP1a/4 y el ciclo biológico de Astrovirus: aplicación en epidemiología molecular*. Tesis de doctorado. España. Universidad de Barcelona. 233 (3): 25, 63, 78.

Guix, S., Caballero, S., Bosh, A., Pintó, R., 2004. C-Terminal nsP1a protein of human Astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. 10 (3): 13627-13630.

Hardy, M., 2005. Norovirus protein structure and fuction. *Microbiolgy Letters*. 8 (1): 3.

Herrero, L., 2011. Viruses, definitons and reality. *Revista de Biología tropical*. 7 (1): 3.

Hunt, M., 2010. Basic virology: Definitions, classification, Morphology and Chemistry. *Redalyc*. 7 (1):1.

Hyde, J., Gillespie, L., Mackenzie, J., 2012. Mouse norovirus I utilizes the cytoskeleton network to establish localization of the replication complex proximal to the microtubule organizing center. *Journal of virology*. 13 (3): 4115, 4117-4118.

Hyde, J., Mackenzie, J. 2010. Subcellular localization of the MNV-1 ORF 1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex. *Virology*. 1(10): 138.

Hoffman, D., Seebach, J., Foley, B., Frosner, G., Nadas, K., Protzer, U., Schätz, H., 2010. Isolated norovirus GII.7 strain within an extended GII.4 outbreak. *Journal Medical Virology*. 6 (1): 82.

Hogbom, M., Jäger, K., Robel, I., Unge, T., Rohayem, J., 2009. The active form of the norovirus RNA dependent RNA polymerase is a homodimer with cooperative activity. *Journal of General Virology*. 11 (1): 281.

Hughes, P., Stanway, G., 2000. The 2A proteins of three diverse picornaviruses are related to each other and to the H-rev 107 family of proteins involved in the control of cell proliferation. *Journal of General Virology*. 7 (1): 201.

International Committee on Taxonomy of Viruses., 2012. Londres, disponible en: <http://www.ictvonline.org/virusTaxInfo.asp>

International Committee on Taxonomy of Viruses., 2015. Londres, disponible en: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>

Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal., 2015. México, disponible en: <http://www.inafed.gob.mx>

Jonassen, M., Jonassen, T., Sveen, M., Grinde, B., 2003. Complete genomic sequences of Astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. *Virus Research*. 6 (1): 195.

Kim, Y., Lovell, S., Tiew, K., Mandadapu, S., Alliston, K., Battalio, K., Groutas, W., Chang, K., 2012. Broad spectrum antivirals against 3C or 3C-Like proteases of picornaviruses, noroviruses and coronaviruses. *Journal of virology*. 9 (1): 11754.

Kim, Y., Kim, J., Hong, K., Cho, R., Yoon, S., 2015. Deeper understanding of Norovirus and Astrovirus by analyzing genome and coding sequence using a priori

algorithm. *International Journal of Information and Education Technology* 5 (1): 134.

Krishna, N., 2005. Identification of structural domains involved in Astrovirus capsid biology. *16 (3): 2-5.*

Koonin, V., Senkevich, T., Dolja, V., 2006. The ancient virus world and evolution of cells. *Biology Direct.* 27 (2): 8-9.

Kopek, B., Perkins, G., Miller, D., Ellisman, M., Ahlquist, P., 2007. Three dimensional analysis of viral RNA replication complex reveals of virus induced mini-organelle. *PLoS Pathogens.* 13 (2): 1-2.

Lajoie, P., Nabie, R., 2007. Regulation of raft-dependent endocytosis. *Journal Cellular and Molecular Medicine.* 10 (1): 644.

Lara, B., Méndez, E., 2010. Role of individual caspases induced by Astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *10 (2): 322-323.*

Leen, E., Baeza, G., Curry, S., 2012. Structure of a murine norovirus N56 protease product complex revealed by adventitious crystallisation. *PLoS one.* 7 (1): 1.

Lewis, T., Matsui, S., 1996. Astrovirus ribosomal frameshifting in a infection transfection transient expresión system. *Journal of Virology.* 7 (1): 2869.

Li, L., Diab, S., MacGraw, S., Barr, B., Traslavania, R., Higgins, R., Talbot, T., Blanchard, P., Rimoldi, G., Fahsbender, E., Page, B., Phan, T., Wan, C., Deng, X., Pesavento, P., Delwart, EA., 2014. Divergent Astrovirus associated with neurologic disease in cattle. *Emerging Infect Disease.* 2 (8): 1388-1389.

Lindesmith, L., Donaldson, E., LoBue, D; Cannon, J., Zheng, D., Vinje, J., Baric, F., 2008. Mechanisms of GII.4 Norovirus of persistence in human population. *PLoS Medicine.* 1 (22): 209.

Luttermann, C., Meyers, G., 2007. A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA. *Journal of Biological Chemistry*. 11 (2): 7058-7057.

Lochridge, V., Jutila, K., Graff, J., Hardy, M., 2005. Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *Journal of General Virology*. 8 (2): 2799-2800.

Marsh, M., Helenius, A., 2006. Virus entry: Open sesame. *Cell*. 12 (2): 729-730.

Martella, V., Lorusso, E., Decaro, N., Elia, G., Radogna, A., D'Abramo, M., Desario, C., Cavalli, A., Corrente, M., Camero, M., Germinario, C., Banyai, K., Di, B., Marsilio, F., Carmichael, L., Buonavoglia, C., 2008. *Emerging Infectious Disease*. 1 (3): 1.

Martella, V., Moschidou, P., Buonavoglia, C., 2011. Astroviruses in dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 6 (1): 1087.

Martella, V., Moschidou, P., Pinto, P., Catella, C., Desario, C., Larocca, V., Circella, E., Banyai, K., Lavazza, A., Magistrali, C., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2011. Astrovirus in rabbits. *Emerging Infectious Diseases*. 7 (2): 2887-2889

Martino, B., Marsilio, F., Carmichael, L., Buonavoglia, C., 2008. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerging Infectious Diseases*. 3 (2): 1307-1308.

Maroor, M., Kurshid, A., Suleman, M., Shaukat, S., Sharif, S., Angez, M., Naeem, M., Zahoor, S., 2013. Serotype diversity of astroviruses in Rawalpindi Pakistan during 2009-2010. *PLoS one*. 5 (1): 1.

Mastrangelo, E., Pezzullo, M., Tarantino, D., Petazzi, R., Germani, F., Kramer, D., Robel, I., Rohayem, J., Bolognesi, J., Milani, M., 2012. Structure based inhibition of norovirus RNA dependent RNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 7 (1): 101.

Mateu, M., 2013. Assembly, stability and dynamics of virus capsid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 8 (1): 1.

Méndez, E., Guerrero, A., Zavala, G., Arias, C., 2007. Association of the Astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *Journal of Virology*. 11 (6): 10649-10650, 10653, 10656-10658.

Méndez, E., Muñoz, C., Sanchez, C., Aguirre, G., Baños, R., Gutierrez, M., Espinoza, R., Acevedo, Y., Arias, C., López, S., 2014. Characterization of human Astrovirus cell entry. *Journal of Virology*. 9 (1): 2455.

Meng, K., Dunker, A., Uversky, V., 2008. A comparative analysis of viral matrix proteins using disorder predictors. *Virology Journal*. 10 (1): 1.

Mesquita, J., Barclay, L., Nascimento, M., Vinjé, J., 2010. Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*. 3 (2): 981-982.

Mooser, A., Schultz, S., 2005. Pathogenesis of Astrovirus infection. *Viral Immunology*. 6 (1): 1.

Meyer, C., Bauer, I., Antonio, M., Adeyemi, M., Saha, D., Oundo, J., Ochieng, J., Omoro, R., Stine, Colin., Wang, D., Holtz, L., 2015. Prevalence of classic MLB-clade and VA-clade Astrovirus in Kenya and the Gambia. *Virology Journal*. 7 (5): 1-5.

Moschidou, P., Martella, V., Lorusso, E., Desario, C., Pinto, P., Losurdo, M., Catella, C., Parisi, A., Banyai, K., Buonavoglia, C., 2011. Mixed infection by feline Astrovirus and feline panleukopenia virus in domestic cat with gastroenteritis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 3 (1): 583.

Munninck, O., Cotten, M., Canuti, M., Deijis, M., Maarten, J., van Hemert, F., Phan, M., Bakker, M., Jazaeri, S., Kellman, P., van der Hoek, L., 2016. *Virus Evolution*. 9 (3): 1, 7-8.

Naphtine, S., Lever, R., Powell, M., Jackson, R., Brown, D., Brierley, I., 2009. *PLoS one*. 10 (2): 2-3.

Nchoutmboube, J., Viktorova, G., Scott, A., Ford, L., Pei, Z., Waitkins, P., Ernest, R., Belov, G., 2013. Increased long chain acyl-coa synthetase activity and fatty acid import is linked to membrane synthesis for development of Picornavirus replication organelles. *PLoS Pathogens*. 20 (3): 2-4.

Olivares, R., Gómez, M., Schwentesius, R., Carrera, B., 2009. Alternativas a la producción y mercadeo para la carne de conejo en Tlaxcala, México. *Región y sociedad*. 17 (1): 199.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación., 2010. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/019/as497s/as497s.pdf>

Oldstone, M., 2012. Anatomy of viral persistence. *PLoS Pathogens*. 4 (2): 1-2.

Oladimeji, O., Smyth, V., Todd, D., 2012. Detection of avian nephritis virus and chicken Astrovirus in Nigerian indigenous chickens. *African Journal of Biotechnology*. (8) 1: 3949.

Orraca, O., Gonzalez, L., Casanova, C., Guerra, D., Sanabria, J., 2011. Inmunopatología de la influenza A H1 N1. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Rio*. 6 (1): 2.

Otto, P., Clarke, I., Lambden, S., Salim, O., Reetz, J., Tenorio, E., 2011. Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain gene virus: an experimental model to study pathogenesis of norovirus infection. *Journal of Virology*. 8 (1): 12013.

Percy, D., Mukle, A., Hampson, R., Brash, M., 1993. The enteritis complex in domestic rabbits: a field study. *Canadian Veterinary Journal*. 6 (4): 98-101.

Perry, J., Taube, S., Wobus, C., 2009. Murine Norovirus I entry into permissive macrophages and dendritic cell is pH independent. *Virus Research*. 9 (1): 1.

Perry, J., Wobus, C., 2010. Endocytosis of murine Norovirus I into murine macrophages is dependent of dynamin II and cholesterol. *Journal of Virology*. 14 (1): 6163.

Pfitzner, C., Schröder, I., Scheungraber, C., Dogan, A., Runnebaum, U., Dürst, M., Häfner, N., 2014. Digital direct PCR: sensitive and specific method for quantification of CTC in patients with cervical carcinoma. *Scientific Reports*. 7 (1): 1.

Prasad, V., Rothnagel, R., Jiang, X., Estes, M., 1994. Three-dimensional structure of Baculovirus expressed Norwalk virus capsid. *Journal of Virology*. 9 (1): 5117.

Prasad, V., Hardy, M., Dokland, T., Bella, J., Rossman, M., Estes, M., 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*. 4 (2): 287-289.

Prasad, V., Schmid, M., 2012. Principles of virus structural organization. *National of Health Institutes*. 42 (1): 1.

Regenmortel, V., Mahy, J., 2004. Emerging Issues in virus taxonomy. *Emerging infectious diseases*. 6 (1): 8.

Rivera, R., Nollens, H., Watson, S., Gulland, F., Wellehan, H., 2010. Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *Journal General of Virology*. 8 (2): 166-167.

Rohayem, J., Robel, I., Jägner, K., Scheffler, U., Wolfram, R., 2006. Protein primed and De novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3D<sup>pol</sup>. *Journal of Virology*. 10 (2): 7060,7063.

Ross, H., Ivanovska, I., Evilevitch, A., Wuite, G., 2007. Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 14 (1): 1.

Samji, T., 2009. Influenza A: Understanding the viral cycle life. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 6 (1): 153.

Schulze, O., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M., 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *European Journal of Biochemistry*. 20 (4): 439-442.

Secretaria de Agricultura Ganaderia, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación., 2015. México, disponible en:  
<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/edomex/boletines/2015/mayo/Documentos/B0342015.pdf>

Shah, J., Prerak, D., Zhang, Y., Scharber, S., Baller, J., Xing, Z., Carol, J., 2016. Development of the intestinal RNA virus community of healthy broiler chickens. *PLoS one*. 13 (3): 8-10.

Sharp, T., Guix, S., Katayama, K., Crawford, S., Estes, M., 2010. Inhibition of cellular protein secretion by Norwalk virus nonstructural protein p22 requires a mimic of an endoplasmic reticulum export signal. *PLoS one*. 15 (4): 1, 4-7.

Sohn, A., Litwin, S., Seeger, S., 2009. Mechanism for CCC DNA synthesis in Hepadnaviruses. PLoS one. 1 (6):

Sola, I., Gómez, M., Almazán, S., Zuñiga, S., Enjuanes, L., 2011. RNA-RNA and RNA protein interaction in Coronavirus replication and transcription. RNA Biology. 8 (1): 237.

Soriano, V., Treviño, A., 2010. Nuevos retrovirus humanos. Medicina Clínica Elsevier. 2 (1): 65.

Sosnovtsev, S., Belliot, G., Chang, K., Prikhodko, V., Thackray, L., Wobus, C., Karst, S., Virgin, H., Green, K., 2006. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. Journal of Virology. 16 (1): 7816.

Stenglein, M., Velazquez, E., Greenacre, C., Wilkes, R., Ruby, G., Lankton, J., Ganem, D., Kennedy, M., DeRissi, J., 2012. Complete genome sequence of an Astrovirus identified in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) with gastroenteritis. Virology Journal. 10 (1): 1.

Subba-Ready, C., Goodfellow, I., Kao, C., 2011. VPg primed RNA synthesis of Norovirus RNA dependent RNA polymerase by using a novel cell based assay. Journal of virology. 11 (2): 3029,3031.

Subba-Ready, C., Yunus, M., Goodfellow, I., Kao, C., 2012. Norovirus RNA synthesis is modulated by an interaction between the viral RNA dependent RNA polymerase and the major capsid protein, VP1. Journal of Virology. 12 (4): 10141-10144.

Sun, M., Grigsby, F., Gorelick, R., Mansky, M., Forsyth, K., 2014. Retrovirus-Specific Differences in Matrix and Nucleocapsid Protein-Nucleic Acid Interactions: Implications for Genomic RNA Packaging. *Journal of virology*. 10 (1): 1271.

Tan, M., Jiang, X., 2005. The P domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *Journal of Virology*. 14 (1): 14017.

Tao, H., Ye, Q., 2010. RNA virus replication complexes. *PLoS Pathogens*. 3 (2): 1.

Ting, Y., Nisic, M., Yu, X., Xia, Q., Yu, X., Xia, Y., Yang, S., 2014. Point-of-Care Microdevices for Blood Plasma Analysis in Viral Infectious Diseases. *Annals of Biomedical Engineering*. 10 (1): 2333.

Thorne, L., Goodfellow, I., 2014. Norovirus gene expression and replication. *Journal of Virology*. 14 (1): 281.

Traub, M., 2009. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10 (1): 583.

Uribarren, B., 2015. Generalidades de virus. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Microbiología y Parasitología UNAM. 1 (1): 1

Vlasak, M., Goesler, I., Blaas, D., 2005. Human Rhinovirus type 89 variants use heparan sulfate proteoglycan for cell attachment. *Journal of Virology*. 8 (1): 5963.

Vongpunsawad, S., Prasad, V., Estes, M., 2013. Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. *Journal of virology*. 8 (5): 4819-4823.

Walter, J., Mitchel, D., 2003. Astrovirus infection in children. *Current Opinion on Infectious Diseases*. 6 (1): 247.

Wang, H., Constantini, V., Saif, J., 2005. Porcine enteric Calicivirus: genetic and antigenetic relatedness to human Calicivirus, diagnosis and epidemiology. *Vaccine*. 22 (1): 1.

Whelan, R., Kaplinskiy, V., Kitsis, N., 2010. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annual Review of Physiology*. 23 (2): 20-41.

White, K., Enjuanes, L., Berkhout, B., 2011. RNA virus replication, transcription and Recombination. *RNA Biology*. 2 (1): 182.

Widdowson, A., Rockx, B., Schepp, R., Van der, W., Poel, W., Vinje, J., Duynhoven, Y., Koopmans, M., 2005. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *Journal Medical Virology*. 5 (1): 1.

Wu, B., Grigull, J., Ore, O., Morin, S., White, K., 2013. Global organization of a positive strand RNA virus genome. *PLoS Pathogens*. 15 (1): 1.

Xia, M., Wei, C., Wang, L., Cao, D., Meng, J., Jiang, X., Tan, M., 2016. A trivalent vaccine candidate against hepatitis E virus, norovirus and Astrovirus. *Vaccine*. 9 (2): 7-8.

Yan, H., Yagyu, F., Okitsu, S., Nishio, O., Ushijima, H., 2003. Detection of Norovirus (GI, GII), sapovirus and Astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *Journal of Virology Methods*. (2): 40-41.

Zandi, R., Reguera, D., Bruinsma, R., Gelbart, W., Rudnick, J., 2004. Origin of icosahedral symmetry in viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 5 (1): 1.

Zheng, D., Ando, T., Fankhauser, R., Beard, R., Glass, R., Monroe, S., 2005. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 12 (1): 316.

Zeiss, J., 2003. The apoptosis necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology*. 1 (15): 481.

Zeitler, C., Estes, M., Prasad, V., 2006. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus protease at 1.5 Å resolution. *Journal of Virology*. 9 (1): 5050.

Zimmer, C., 2006. Did DNA come from viruses?. *Science news*. 312 (2): 870-872.

## 12. ANEXOS

### 12.1 PROTOCOLO DE RT

Kit Improm II™ Reverse Transcription System (Promega)

Se realizó un mix inicial que contenía 3 µl de RNA, 2µl de oligo DT y se incubó a 70°C durante 5 minutos.

Posteriormente se elaboró un segundo mix para complementar la reacción.

Reactivo	Cantidad (µl)
Improm II™ 5x Reaction Buffer	4.0
MgCl <sub>2</sub>	2.4
dNTP mix	1.0
Recombinant RNasin®	0.5
Improm II™ Reverse Transcriptase	1
Nuclease free water	6.1
Ajustado	15

Programa:

Temperatura	Tiempo (minutos)
25 °c	5
42 °c	80
70 °c	15

## 12.2 REACTIVOS DE PCR ASTROVIRUS Y NOROVIRUS

### Reactivos PCR Astrovirus

Reactivo	Cantidad (µl)
Agua libre de nucleasas	12.5
Solución green	5
MgCl <sub>2</sub>	2
dNTP´s	1
panAstVFor2	1
panAstVRev	1
Go Taq®	0.5
CDNA	2
	25

### Reactivos PCR Norovirus

Reactivo	Cantidad (µl)
Agua libre de nucleasas	13.25
Solución green	5
MgCl <sub>2</sub>	1.5
dNTP´s	1
NoVF	1
NoVRev	1
Go Taq®	0.25
CDNA	2
	25

## 12.3 PROTOCOLO DE CLONACIÓN

1.- Se realiza gel de agarosa 2x para la obtención de amplicones que se utilizaran en el proceso de purificación (el tamaño es específico por fragmento). Se cargan de 20 a 40 µl del producto de PCR por pozo y se realiza la electroforesis. Posteriormente se visualiza el gel en lámpara U.V y se tiñe con bromuro de etidio. Los fragmentos amplificados se cortan con una navaja de bisturí y se colocan en un vial eppendorf de 2 ml.

2.- Purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa

2.1.- Obtenido el fragmento se pesa y se adicionan 3 volúmenes de yoduro de sodio en una concentración 6 molar.

2.2.- Incubar a 55 °c durante 5 a 10 minutos o hasta que la agarosa se disuelva completamente.

2.3.-Adicionar 15 µl de perlas de sílica e incubar de 30 a 60 minutos.

2.4.- Decantar y resuspender el pellet en 500 µl de solución de lavado y centrifugar durante 4 minutos a 12,000 rpm a 4°C (realizar por duplicado).

2.5.-Decantar el sobrenadante y secar el pellet por calor.

2.6.-Resuspender el pellet en 300 µl de agua estéril e incubar 5 minutos a 55 °c.

2.7.-Centrifugar a 12,000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente.

2.8.- Recuperar el sobrenadante en un vial limpio.

2.9.- Visualizar los productos de 5 a 10 µl de purificado en gel de agarosa 2x o según sea el caso.

3.- Ligación

\*Kit PGEM-T Easy vector System I

3.1.-Se realiza cálculos de concentración para calcular el mix, con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Kb inserto}}{\text{Kb vector}} \times \text{ng del vector}$$

Donde:

Kb inserto: tamaño del amplicón

Kb vector: tamaño de vector (referirse a la hoja)

ng del vector: concentración (pGEM-T Easy Vector)

$$\frac{0.3 \text{ kb}}{3 \text{ kb}} \times 50 \text{ ng del vector} = 5 \text{ ng (ng de inserto necesario 1:1)}$$

Proporción 1:3 es decir 50 ng vector – 15 ng de inserto

**Tip:** The Biomath calculator ([www.promega.com/biomath](http://www.promega.com/biomath)) can be used to determine the amount of insert DNA needed. The pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector size is 3015bp.

2. Set up ligation reactions as described below. Vortex the 2X Rapid Ligation Buffer vigorously before each use. Use 0.5ml tubes known to have low DNA-binding capacity.

Reagents	Standard Reaction	Positive Control	Background Control
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5µl	5µl	5µl
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector (50ng)	1µl	1µl	1µl
PCR product	Xµl	–	–
Control Insert DNA	–	2µl	–
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1µl	1µl	1µl
Deionized water to a final volume of	10µl	10µl	10µl

3. Mix the reactions by pipetting. Incubate the reactions 1 hour at room temperature. Alternatively, incubate the reactions overnight at 4°C for the maximum number of transformants.

Datos para calculo de ng vector-inserto y mix

Reactivo	Stock	Final	1Rx
Vector (PGEM)	50 µg/ml	50µg/ml	1µl
Inserto (DNA)	?	+De acuerdo a la banda	3µl
Ligasa (T4 DNA)	3 Wv/ml	3Wv/ml	1µl
*Buffer 2x	2x	1x	5µl
Agua libre de nucleasas	0	0	0

Ajustado a 10µl

+Las bandas que se observan intensas necesitan aproximadamente 2µl, para bandas más tenues pueden utilizarse hasta 5µl.

\*El buffer se encuentra muy diluido por lo que el porcentaje del agua es aprovechado para sustituirlo.

3.2.- Incubar 12-24 horas a 37.5 °c con movimiento.

4.- Transformación

4.1.- Descongelar en hielo las células competentes.

4.2.- Agregar 6µl del ligado y 100µl de células.

Porque:

50 ng/µl = 5 ng/µl

30 ng del ligado del DNA= 6 µl

4.3.- Se les da un golpecito a los viales y se incuban 30 minutos en hielo.

4.4.- El shock térmico se realiza a 42°C durante 1 minuto en baño maria.

4.5.- Se deja en hielo 2 minutos.

4.6.- Se ajusta a 1 ml (900 µl de medio LB o Luria Bertani líquido y 100µl del ligado). Colocar el medio LB con las muestras en el hielo.

4.7.- Incubar 1 hora a 37.5°C en movimiento.

4.8.- Se centrifuga 10 minutos a 3,600 rpm.

4.9.- El pellet se resuspende en 200µl del mismo medio, lo demás es desechado.

4.10.- Se plaquean 100 µl en una placa con LB, IPTG´S, X-Gal y ampicilina

4.11.- Incubar de 12-24 horas.

5. Se crea un stock de clonas (colonias blancas) en una sola placa de LB, en este caso se seleccionaron 5 colonias.

6.- Se toma ½ colonia de un lado y ½ de la misma con una punta de 20 µl. La primera mitad se siembra en la placa y la otra ½ se sumerge en 900µl de agua inyectable.

7.- Mezclar los viales por pipeteo.

8.- Lisar mediante calor con un ciclo de 94°C por 10 minutos y 4α.

9.- Realizar mix con 5 μl de células lisadas.

10.- Cálculo de concentración y mix para PCR

Mix	Stock	Final	1 Rx
DNA	?	5 u/rx	5 μl
Taq pol	5 u/μl	1 u/rx	0.2 μl
d´NTPS	2 mμ	0.2 mμ	2 μl
Primers	10 mμ	0.2 mμ	0.4 μl x 2= 0.8 μl
Buffer	10x	1x	2 μl
MgCl <sub>2</sub>	30 mμ	1.5 mμ	1 μl
Agua L.N	Cbp 20 μl		9 μl

Cálculo para mix (excepto la taq pol):

Primers: 0.4 μl x Rx

C1- 10 mμ

V1- ?

C2- 0.2 mμ

V2- 20 μl

Se divide

Se multiplica

Cálculo para la taq pol:

1 u/rx – 5 u/μl

? - 1 u/μl

Taq pol: 0.2 μl x Rx

## Programa de PCR

94°C x 5 minutos

94°C x 30 seg  
T.M x 30 seg  
72 °C x 40 seg

} 30 ciclos

72 °C x 5 minutos

10.1 Se visualiza en gel de agarosa 3x

11.- Preparación del stock.

11.1.- Se escogen las colonias que mejor se visualizan en el gel de agarosa que en este caso se elige una.

11.2.- Se crecen en LB líquido y ampicilina, que para este caso se tiene un volumen de 230 ml y requiere de 345 µl.

11.3.- Se adiciona 7 ml de LB por colonia y se incuban de 12 a 24 horas, con los tubos inclinados.

11.4.- En el caso del stock se toma 1.5 µl de LB que se quedo incubando, se coloca en un vial y se centrifuga a 3,600 rxm durante 8 minutos, se decanta y se coloca nuevo medio LB y ampicilina con glicerol al 16% y se almacena (congelación).

12.- Preparación de la miniprep.

\* Se procesa con el kit Vivantis GF1-Plasmid DNA Extraction Kit, según las instrucciones del fabricante..

13.- Realizar electroforesis en un gel 3x para visualizar el plásmido.

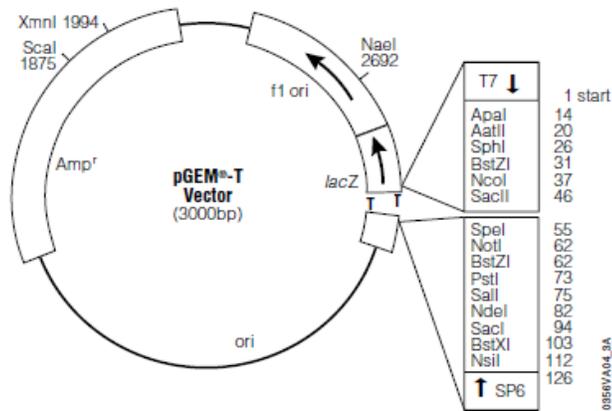
Mix de carga:

2 µl de colorante 5x

4 µl de muestra

2 µl de Agua libre de nucleasas





Mapa del vector

Puntos de referencia del PGEM® T Vector

Región	Nucleótidos
T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–113
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	124–143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161–177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185–201
β-lactamase coding region	1322–2182
phage f1 region	2365–2820
<i>lac</i> operon sequences	2821–2981, 151–380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941–2957
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2984–3

## 12.5 SECUENCIAS Y NÚMEROS DE ACCESO

Nombre en este estudio	Número de acceso: GenBank	Especie
NAUSIK-08ITA	JN052023.1	Conejo
CON-USA12	JF729316.1	Conejo
ASTV-PAVO 1	KT355320.1	Pavo
ASTV-PAVO 2	KT355317.1	Pavo
ASTV-MUR 1	EU847154.1	Murciélago
ASTV-MUR 2	EU847153.1	Murciélago
AVASTROVIRUS	Y15936.2	Ave
ASTV-MUR 3	KP843562.1	Murciélago
ASTV-YAK	KM822593.1	Yak
MAMASTROVIRUS 2	KM017743.1	Felino
ASTV-FELINO ORFIA	KM017741.1	Felino
ASTV-FELINO ORFIB	KM017741.1	Felino
ASTV-YAK1AB	KM822593.1	Yak
ASTV1-BOVNSP1A	KJ620980.1	Bovino
ASTV1-BOVNSP1AB	KJ620980.1	Bovino
ASTV2-BOVNSP1A	KJ620979.1	Bovino
ASTV2-BOVNSP1AB	KJ620979.1	Bovino
MAMASTROVIRUS 2-1	KF155290.1	Felino
ASTV-FELINO NSP1AB	KF499111.1	Felino
ASTV-FELINO NSP1A	KF499111.1	Felino
MAMASTROVIRUS 3	KF787112.1	Porcino
ASTV-PATO RDRP	KJ020899.1	Pato
ASTV-PATO NSP	KJ020899.1	Pato

