

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS



**"CLONACIÓN EN *Saccharomyces cerevisiae* Y ANÁLISIS
BIOINFORMÁTICO DE LOS ADN_s COMPLEMENTARIOS DEL
VIRUS DE LA TILAPIA LACUSTRE (TiLV)"**

Presentada por:

MARIO DAVID CUEVA TÁVARA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**

Lima – Perú

2024

Tesis Mario Cueva sin referencias

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

7%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|---|--|-----|
| 1 | patents.google.com Fuente de Internet | 1% |
| 2 | hdl.handle.net Fuente de Internet | 1% |
| 3 | pubag.nal.usda.gov Fuente de Internet | <1% |
| 4 | Submitted to Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales (FLACSO) - Sede Ecuador Trabajo del estudiante | <1% |
| 5 | Arnaldo Edward Castañeda Vargas, Manuel Manuel Feria, Odalis Odalis Toledo, Deysy Castillo, Mario Cueva, E. Motte. "Detección del virus de la tilapia del lago (TiLV) mediante semi-nested RT-PCR en tilapias cultivadas provenientes de dos regiones del Perú", Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 2020 Publicación | <1% |
| 6 | doku.pub Fuente de Internet | <1% |

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**

**“CLONACIÓN EN *Saccharomyces cerevisiae* Y ANÁLISIS
BIOINFORMÁTICO DE LOS ADN_s COMPLEMENTARIOS
DEL VIRUS DE LA TILAPIA LACUSTRE (TiLV)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE**

Presentada por:

MARIO DAVID CUEVA TÁVARA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Gastón Zolla Benites
PRESIDENTE

Ph.D. Ana Kitazono Sugahara
ASESORA

Ph.D. Gretty Villena Chávez
CO-ASESORA

Dra. Ilanit Samolski Klein
MIEMBRO

Dra. Patricia Gil Kodaka
MIEMBRO

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón
MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

*A mis padres, por su infinito amor y aliento,
A Mel, que me motivó y acompañó con maletas a iniciar esta aventura,
A Amiri, que, aunque no lo sepa, es mi horizonte y motivo de superación.*

AGRADECIMIENTOS

A PROCENCIA y CONCYTEC, por la subvención otorgada en el marco del convenio N° 177-2015 para el programa doctoral.

A la Dra. Ana Kitazono, no hay nada que no le pueda agradecer,

A la Dra. Gretty Villena, por la ayuda brindada en todo momento,

A mis padres, por todo el aliento desde siempre,

A Mel, por toda la ayuda incondicional, gracias por tanto amor,

A los amigos que me ha regalado este doctorado, en especial a los chicos del Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis, UNALM.

A Miki y Luis, por hacer divertida la estancia en el lab,

A Gustavo Ramírez, por el viaje y la experiencia durante el muestreo,

A todos los que dejaron alguna experiencia durante el proceso,

Gracias por tanto.

ÍNDICE GENERAL

| | | |
|--------|--|----|
| I. | INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. | REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. | Tilapia | 3 |
| 2.2. | Patologías comunes..... | 3 |
| 2.3. | Sintomatología viral por TiLV | 5 |
| 2.4. | Genoma viral..... | 5 |
| 2.4.1. | Características de los principales genomas virales | 5 |
| 2.4.2. | Genoma del TiLV..... | 10 |
| 2.5. | Mecanismos de infección..... | 15 |
| 2.6. | Ciclo de replicación viral | 16 |
| 2.7. | Respuesta inmunitaria..... | 17 |
| 2.8. | Clonación | 18 |
| 2.9. | Clonación <i>in vivo</i> en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 20 |
| III. | MATERIALES Y MÉTODOS | 23 |
| 3.1. | Obtención de tejidos de Tilapia con sintomatología viral | 23 |
| 3.2. | Mapa del plásmido | 25 |
| 3.3. | Diseño de iniciadores..... | 27 |
| 3.4. | Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario..... | 29 |
| 3.5. | Amplificación de los ADNc virales mediante PCR..... | 30 |
| 3.6. | Clonación <i>in vivo</i> en levaduras | 30 |
| 3.7. | Extracción de ADN total de clones de levadura y verificación del inserto | 31 |
| 3.8. | Recuperación y amplificación de plásmidos en <i>Escherichia coli</i> | 32 |
| 3.9. | Secuenciamiento | 32 |
| 3.10. | Análisis bioinformático | 32 |
| IV. | RESULTADOS..... | 34 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.1. | Diseño de iniciadores | 34 |
| 4.2. | Extracción de ARN y obtención de los fragmentos a clonar | 37 |
| 4.3. | Clonación <i>in vivo</i> | 38 |
| 4.4. | Recuperación de plásmidos en <i>E. coli</i> | 40 |
| 4.5. | Secuenciamiento y análisis bioinformático | 41 |
| 4.6. | Análisis filogenético | 42 |
| V. | DISCUSIÓN..... | 44 |
| VI. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 49 |
| VII. | ANEXOS | 64 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Tipo y número de genomas virales con secuencias reportadas al 2019 ^(*) | 8 |
| Tabla 2: Relaciones de similitud entre el genoma del TiLV y otros ortomixovirus. | 15 |
| Tabla 3: Números de acceso (GenBank) de las secuencias virales de TiLV empleadas en el diseño de iniciadores..... | 28 |
| Tabla 4: Secuencias de los iniciadores utilizados | 35 |
| Tabla 5: Eficiencias de transformación y clonación por segmento viral..... | 38 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Países con brotes de TiLV reportados hasta el año 2021. | 2 |
| Figura 2: Espécimen juvenil de <i>Oreochromis niloticus</i> “Tilapia”. | 3 |
| Figura 3: Características de un espécimen de tilapia infectado con TiLV. | 5 |
| Figura 4: Principales virus ADN patógenos de vertebrados clasificados de acuerdo a sus propiedades genómicas. | 6 |
| Figura 5: Principales virus ARN patógenos de vertebrados clasificados de acuerdo a sus propiedades genómicas. | 7 |
| Figura 6: Representación genómica del TiLV a partir de un modelo de orthomyxovirus. | 11 |
| Figura 7: Predicción de ORFs en Segmento 1 del TiLV. | 12 |
| Figura 8: Predicción de ORFs en Segmento 2 del TiLV. | 12 |
| Figura 9: Predicción de ORFs en el Segmento 6 del TiLV. | 13 |
| Figura 10: Predicción de ORFs en el Segmento 9 del TiLV. | 14 |
| Figura 11: Representación esquemática de la infección del virus ISAV en una célula de pez. | 17 |
| Figura 12: Sistema tradicional de clonación en bacterias. | 19 |
| Figura 13: Comparación entre las principales metodologías de clonación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 22 |
| Figura 14: Esquema metodológico para el desarrollo de la tesis. | 23 |
| Figura 15: Poza de cultivo de alevines de tilapia con presencia de TiLV. | 24 |
| Figura 16: Colecta de tejidos de tilapia proveniente de una poza de cultivo con brotes de mortalidad. | 25 |
| Figura 17: Mapa del plásmido pEG(H). | 27 |
| Figura 18: Ubicación referencial de los iniciadores diseñados para este estudio. | 29 |
| Figura 19: Extracción de ARN de tejidos de tilapia. | 37 |

| | |
|--|----|
| Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa mostrando los fragmentos obtenidos por PCR para la clonación correspondiente a cada segmento viral..... | 38 |
| Figura 21: Resultados del proceso de clonación <i>in vivo</i> del Segmento 5. | 39 |
| Figura 22: Verificación de la presencia del inserto del ORF1 mediante PCR a partir de ADN genómico total de 14 transformantes de levadura | 40 |
| Figura 23: Verificación de la clonación de los fragmentos T1 a T10 en el plásmido pEGH mediante PCR | 41 |
| Figura 24: Alineamiento de las secuencias obtenidas de los plásmidos mostrando parte de la región codificante de polihistidinas y los codones de inicio de los segmentos respectivos..... | 42 |
| Figura 25: Filogenia de TiLV. Comparación filogenética de genomas completos de TiLV reportados en seis países distintos. | 43 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1: Secuencias genómicas de TiLV reportadas en la base de datos GenBank (NCBI, Octubre, 2022)..... | 64 |
| Anexo 2: Secuencias nucleotídicas de los segmentos virales clonados en el plásmido pEGH. | 66 |

RESUMEN

La clonación y expresión de proteínas en sistemas heterólogos son herramientas muy útiles para el estudio de proteínas virales. En este trabajo, una estrategia de clonación *in vivo* fue aplicada usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como un método eficiente y económico para clonar los ADN complementarios (ADNc) del virus de la tilapia lacustre (TiLV). Este virus está asociado a mortalidades masivas de tilapia *Oreochromis niloticus* alrededor del mundo, incluyendo Perú. Los ADNc sintetizados a partir del ARN extraído de los especímenes infectados permitió la clonación de todos los segmentos virales, con altas eficiencias. Además, el análisis bioinformático de las secuencias permitió establecer una relación filogenética con gran homología con otra cepa previamente reportada en Ecuador y causante de brotes de hepatitis sincitial desde 2012.

Palabras clave: clonación *in vivo*, TiLV, filogenia.

ABSTRACT

Cloning and protein expression in heterologous systems are very useful tools for the study of viral proteins. In this work, an *in vivo cloning* strategy was applied using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, as an efficient and low-cost method to clone the complementary DNAs (cDNAs) from the Tilapia Lake Virus (TiLV), which is associated to worldwide massive mortalities of tilapia *Oreochromis niloticus* including Peru. Complementary DNAs synthesized from infected fish tissues allowed the cloning of all the viral segments with high efficiencies; while the bioinformatic analysis allowed the elucidation of a close phylogenetic relationship with a previously reported Ecuadorian strain responsible of syncytial hepatitis outbreaks since 2012.

Keywords: *In vivo* cloning, TiLV, phylogeny.

I. INTRODUCCIÓN

Tilapia es el nombre común de un grupo comprendido por más de 100 especies de cíclidos, de extrema importancia ya que es la tercera especie piscícola más relevante, con una producción estimada de 6.8 millones de toneladas en el 2020; lo cual representa un aumento de alrededor del tres al cuatro por ciento en comparación al año anterior, impulsado principalmente por el aumento de las cosechas en Asia, donde China sigue siendo el mayor proveedor con 26 por ciento de la producción total. En el Perú, la tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* y sus híbridos representan la segunda especie más cultivada después de la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*, con una producción de cerca de 3.5 mil toneladas en el 2018 (FAO 2020) y un incremento de 47.6 por ciento en el 2019, siendo Piura y San Martín las regiones que concentran más del 95 por ciento de la producción total, seguidos de lejos por Lima y Lambayeque (PRODUCE, 2020).

Lamentablemente, el cultivo intensivo de tilapia ha conllevado a la aparición de patógenos diversos (Ortega Asencios *et al.* 2016) incluidos algunos virus (betanodavirus, iridovirus y *herpes-like virus*) reportados como causas de enfermedad severa (Surachetpong *et al.* 2017), y el virus de la tilapia lacustre (TiLV) causante de mortalidades masivas en Asia, África, América Central y Sudamérica (Figura 1) (Bacharach *et al.* 2016, Jansen y Mohan 2017, Dong *et al.* 2017, Tattiyapong *et al.* 2018, Behera *et al.* 2018). Desde el 2014, este virus ha sido reportado como agente causal de mortalidades de 10 a 90 por ciento en alevines, juveniles y adultos, causando pérdidas económicas significativas (Al-Hussinee *et al.* 2019).

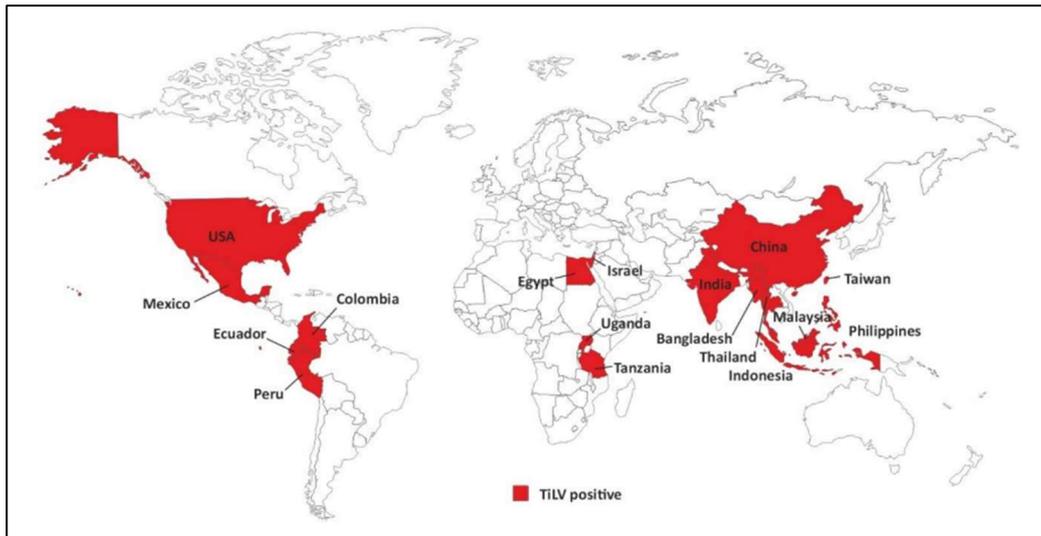


Figura 1: Países con brotes de TiLV reportados hasta el año 2021. FUENTE: (Kembou-Ringert et al. 2023)

A la fecha se han reportado 369 secuencias genómicas completas y 173 secuencias parciales asociadas a los segmentos virales del TiLV en la base de datos GenBank (NCBI), originarios de Israel, Tailandia, Ecuador, Colombia, India, Bangladesh, Estados Unidos y una de Perú (Anexo 1). A pesar de ello, aún existen vacíos de información relacionados a las proteínas virales, análisis filogenéticos y estudios de modelamiento que dificultan el desarrollo de terapéuticos contra el TiLV.

A través de la clonación *in vivo* de los ADNs complementarios (ADNc) del TiLV en la levadura, esta tesis implementa una herramienta de soporte para futuros estudios de caracterización de proteínas y búsqueda de antígenos potenciales contra este virus. Además, mediante el análisis bioinformático de los mismos, se analiza la relación filogenética con otras variantes de TiLV y las mutaciones evolutivas en las secuencias del genoma viral.

Debido a que existe un amplio conocimiento en la producción en *S. cerevisiae* de biomoléculas de interés en salud humana y animal, esta metodología puede ser fácilmente adaptable al estudio de cualquier otro tipo de virus. Asimismo, debe destacarse la aplicación de la técnica de clonación *in vivo* como una herramienta efectiva y de bajo costo en comparación a las técnicas convencionales de expresión de proteínas heterólogas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Tilapia

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino : Animalia
Filo : Chordata
Clase : Actinopterygii
Subclase: Neopterygii
Infraclasse: Teleostei
Superorden: Acanthopterygii
Orden : Perciformes
Familia: Cichlidae
Género: *Oreochromis*
Especie: *O. niloticus*



Figura 2: Espécimen juvenil de *Oreochromis niloticus* “Tilapia”. La fotografía fue tomada en una granja de cultivo en Piura - Perú en el año 2021.

Es un pez originario de África y el Cercano Oriente (Figura 2) y a partir de 1924 se intensificó su cultivo en Kenia, pero es en Malasia donde años más tarde se obtuvieron mejores resultados, dando inicio al cultivo en el ámbito global (Baltazar y Palomino, 2004).

Se caracteriza por su rápido crecimiento y tolerancia a condiciones de baja calidad de agua. Posee dieta omnívora y su cultivo intensivo consta de tres etapas de producción: pre-cría, crecimiento y engorde, con una duración total de seis a siete meses aproximadamente, alcanzando un peso promedio de 300 a 500 g.

3.2. Patologías comunes

Las causas más comunes de enfermedades infecciosas en acuicultura son bacterias (55 por ciento) seguida de los virus (23 por ciento), parásitos (19 por ciento) y hongos (3 por ciento) (Kibenge y Godoy 2016). Sin embargo, debido a la alta frecuencia de infecciones en animales acuáticos y la limitada disponibilidad de terapéuticos, los virus son los patógenos que principalmente afectan a la acuicultura mundial (Kibenge y Godoy 2016, Surachetpong *et al.* 2017).

Entre las enfermedades bacterianas más comunes que afectan la actividad acuícola de tilapia encontramos a las septicemias por *Streptococcus*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* móviles (Clinical and Laboratory Manual of Fish Diseases 2016), mientras que *Saprolegnia* y otros hongos causantes de branquimicosis destacan como patógenos fúngicos en especies de peces dulceacuícolas (Durborow et al. 2003.). Así mismo, *Trichodina* se ha reportado como un protozooario patógeno que infesta frecuentemente las branquias de peces, causando mortalidades en individuos juveniles (Aly, 2013).

Respecto a infecciones virales, en los últimos años se registraron tres nuevos brotes que afectan a la tilapia: el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) (Mulei et al. 2018), el virus de la Viremia Primavera (SVV) en peces de agua dulce (Organización Mundial de Sanidad Animal 2023) y el Virus de la Tilapia del Lago (TiLV) (Eyngor et al. 2014).

El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) es un virus de la familia Birnaviridae, un virus de ARN doble hebra bisegmentado, que causa mortalidades en peces, moluscos y crustáceos, tanto de agua dulce como marina y conocido por ser un patógeno frecuente en trucha arcoíris, salmón del atlántico y otros salmónidos, hasta su identificación en tilapias provenientes de pozas de cultivo en Kenia (Mulei et al. 2018). Usualmente, los brotes de IPNV se asocian a los procesos de estrés a causa del *smolt* (proceso de adaptación de agua dulce a agua salada) e inicio de la alimentación en peces jóvenes. Actualmente se ha identificado una cepa de IPNV que causa mortalidad en individuos de salmón resistentes a IPNV (Hillestad et al. 2021).

Otro virus que afecta el cultivo de tilapia desde los últimos años es el de la viremia primavera de la carpa (SVCV), un virus de la familia Rhabdoviridae, con genoma ARN monocatenario no segmentado, el cual tiene como principal hospedero a la carpa común *Ciprinus carpio* y otras especies de carpa (Familia Cyprinidae). Este virus fue identificado en tilapias provenientes de piscifactorías en Egipto en el 2008 (Soliman et al. 2008). Sin embargo, la susceptibilidad a este virus se considera ambigua a la fecha (Organización Mundial de Sanidad Animal 2023), ya que la tilapia es más resistente al SVCV, aunque bajo condiciones de estrés se puede infectar con el virus, con poca o ninguna signología clínica.

Otros tipos de virus han sido reportados como causa de daños severos en el cultivo de tilapia; entre ellos un herpesvirus (Virus de la encefalitis de larvas de tilapia), un

betanodavirus (Virus de la necrosis nerviosa), Iridovirus (Megalocitivirus) y un nuevo tilapianevirus, confirmado en 16 países desde el 2014 (MacKinnon et al. 2023) causando pérdidas económicas importantes a nivel mundial (Kembou-Ringert et al. 2023).

3.3. Sintomatología viral por TiLV

Los especímenes de tilapia infectados por TiLV (Figura 3) usualmente presentan signos inespecíficos, tales como letargia, pérdida de apetito, además de signos físicos como exoftalmia, descamación, oscurecimiento y ulceraciones en la piel, palidez de las branquias, celoma abultado debido a la acumulación de fluidos internos, hígado congestivo y hemorrágico, esplenomegalia, entre otros (Eyngor *et al.* 2014, Surachetpong *et al.* 2017). Los principales órganos diana asociados a infecciones por TiLV son: cerebro, hígado, bazo y gónadas.

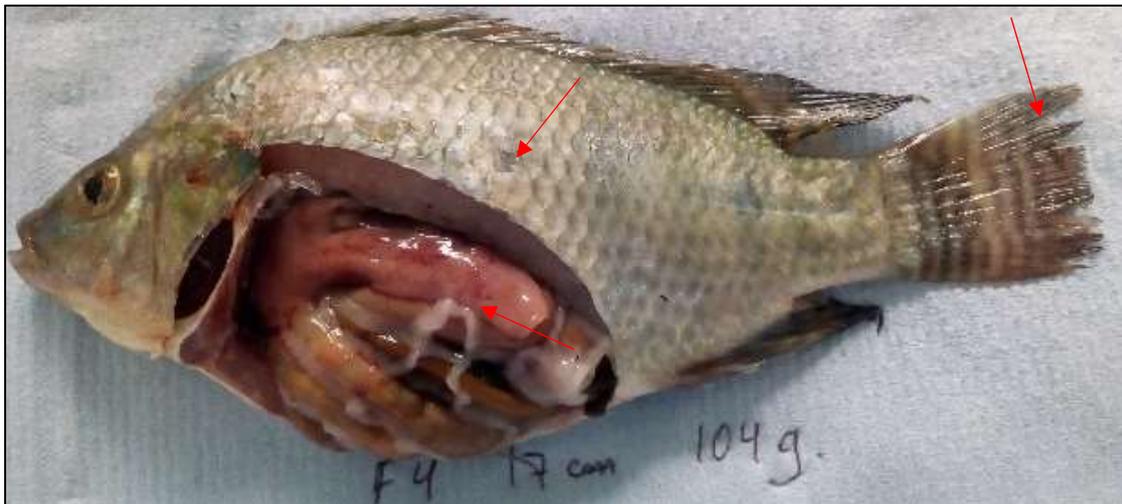


Figura 3: Características de un espécimen de tilapia infectado con TiLV. Obsérvese un individuo colectado en el año 2018 de una poza de cultivo con altas mortalidades. Durante la inspección observamos afectación a las aletas, descamación, petequias en el hígado, esplenomegalia y fluido celómico (flechas rojas), signos recurrentes de infección por TiLV, que fue confirmado posteriormente por RT-qPCR.

3.4. Genoma viral

3.5. Características de los principales genomas virales

Existen más de 4000 genomas virales clasificados en más de 71 familias de acuerdo a la morfología del virión, propiedades del genoma, proteínas y la presencia de otras estructuras y/o proteínas características de las familias virales (Chaitanya 2019, Fauquet 1999), los cuales se resumen en la Figura 4 y Figura 5.

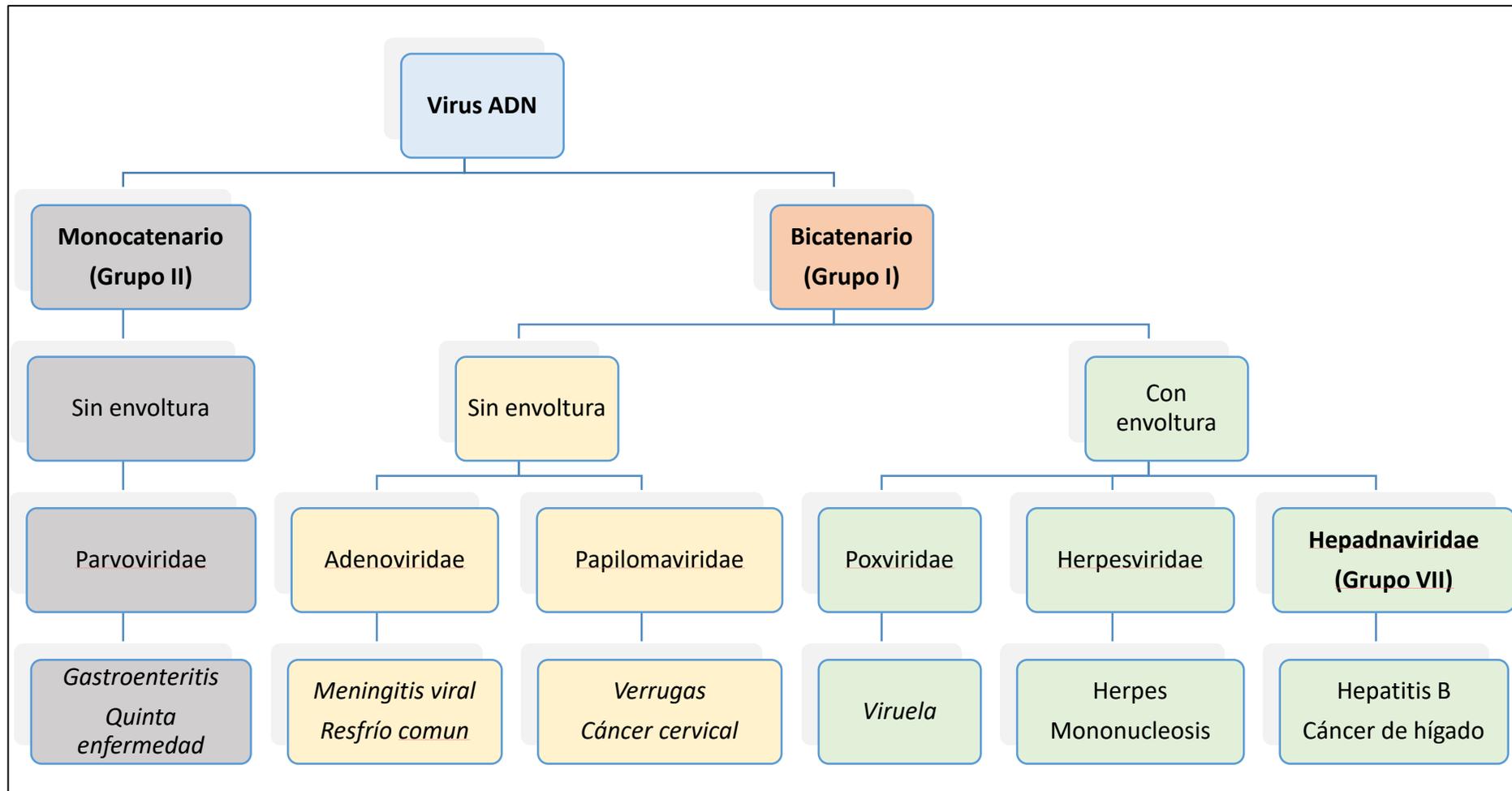


Figura 4: Principales virus ADN patógenos de vertebrados clasificados de acuerdo a sus propiedades genómicas. La clasificación de familias (terminación -viridae) se basa, según Baltimore, en el tipo de genoma viral (ADN) y el mecanismo de síntesis de ARN codificante a partir de ADN monocatenario (Grupo II) o bicatenario (Grupo I). En este esquema se incluye también el Grupo VII, representado por la familia Hepadnaviridae, el cual se diferencia de los demás del Grupo I por su capacidad de retrotranscribir su ARN. Además, esa clasificación se complementa con el tipo de estructura viral y la presencia o no de envoltura. Se muestra un representante de cada familia. Fuente: Propia

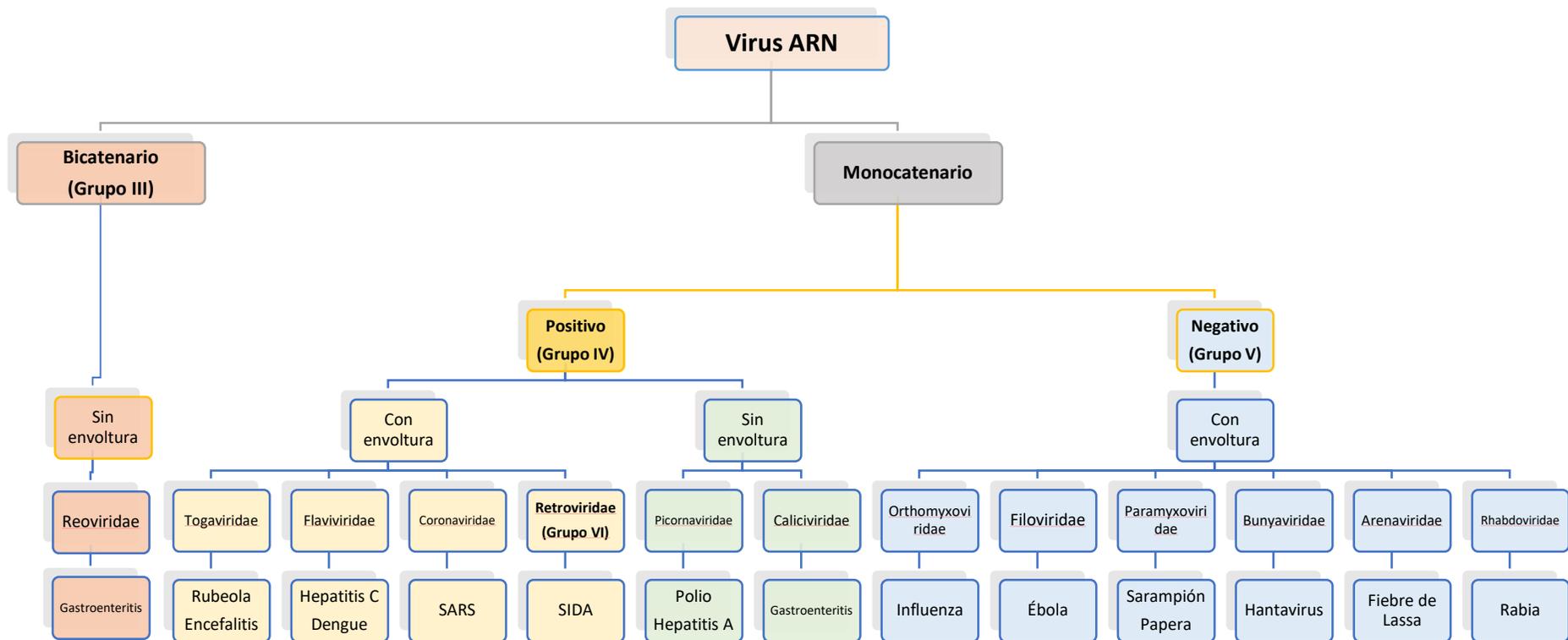


Figura 5: Principales virus ARN patógenos de vertebrados clasificados de acuerdo a sus propiedades genómicas. La clasificación de familias (terminación -viridae) se basa, según Baltimore, en el tipo de genoma viral (ARN) y el mecanismo de síntesis de ARN codificante a partir del ARN bicatenario (Grupo III) o monocatenario sentido positivo (Grupo IV) o sentido negativo (Grupo V). La familia Retroviridae constituye el Grupo VI de la clasificación, la cual se diferencia por la capacidad de retrotranscripción. Además, esa clasificación se complementa con el tipo de estructura viral y la presencia o no de envoltura. Se muestra un representante de cada familia. Fuente: Propia

Actualmente, más de 4 mil tipos de virus han sido descritos y clasificados en más de 71 familias, divididos principalmente en función a su genoma de ADN o ARN (Tabla 1), el cual a su vez se subdivide en hebra simple o doble, con organización monopartita (no segmentado) o multipartita (segmentado) (Chaitanya 2019).

Tabla 1: Tipo y número de genomas virales con secuencias reportadas al 2019^(*).

| Clase | Genoma | Genomas secuenciados | Tamaño (kb) | Proteínas |
|-------|-----------|----------------------|-------------|-----------|
| 1 | dsDNA | 414 | 4,7 - 335 | 6–240 |
| 2 | ssDNA | 230 | 1,3 - 11 | 6–11 |
| 3 | dsRNA | 61 | 3 - 29 | 2–13 |
| 4 | ssRNA (+) | 421 | 2,3 - 31 | 1–11 |
| 5 | ssRNA (-) | 81 | 9 - 25 | 5–6 |

(*) Última versión liberada (V.16) según Reference Viral Database (RVDB).

De forma general, los virus organizan su genoma de dos formas (de acuerdo a la cantidad de moléculas que componen su genoma): en una única molécula continua (genoma no segmentado o monopartito) o en dos o más fragmentos pequeños (genoma segmentado o multipartito). En ambos casos, la molécula única del genoma o los fragmentos del mismo, contienen la información necesaria para la replicación viral.

Todos los genomas de ADN doble hebra son monopartitos y sólo algunos de hebra simple presentan genoma segmentado. En contraste, los genomas virales de ARN pueden ser no segmentados (como el virus del Ébola, Fam. Filoviridae) y otros, con mayor frecuencia, segmentados (como el virus de influenza, Fam. Orthomixoviridae).

Entre los virus con genoma viral ARN sentido positivo se encuentran muchos patógenos de plantas y animales, incluidos virus humanos. Sus genomas varían desde ~30 kb (coronavirus) hasta algunos fagos (~3.5 kb) y sorprendentemente, pueden infectar las células hospederas en ausencia de cualquier proteína viral.

Los virus de ARN sentido negativo difieren de otros virus ARN en varias maneras. Principalmente, el genoma de virus ARN(-) no son infecciosos por sí solos (ya que son secuencias no codificantes) y las partículas virales deben portar su propia polimerasa de ARN dependiente de ARN para iniciar la primera ronda de síntesis de ARN(+). Los virus con genomas ARN(-) son más diversos que los ARN(+) y poseen genomas de mayor tamaño, usualmente de tipo segmentado (Marintcheva 2018).

En los virus de tipo ARN segmentado, a pesar de las diferencias en su genoma, usan las interacciones *trans acting* ARN-ARN para facilitar el co-empaquetamiento de los genomas segmentados, lo cual le permite un empaquetamiento selectivo en una misma partícula viral. Dichas interacciones son mediadas por proteínas y/o estructuras secundarias de los segmentos de ARN viral (Newburn y White 2019). Para los virus ARN no segmentados, la estrategia de empaquetamiento se basa en la interacción con el complejo RNP (ribonucleoproteínas) y el *capping* del extremo 5' viral por una metiltransferasa específica del *cap* (MTasa). Para los virus de ADN, ARN doble hebra y los flavivirus de ARN sentido positivo, éstos siguen la misma vía del *capping* eucariota (Ogino y Green 2019).

El tamaño de los genomas virales también depende del tipo de célula hospedera. Aquellos con células hospederas procariontas necesitan replicarse rápidamente para mantenerse dentro de ellas por más tiempo y completar su replicación, por lo que poseen genomas compactos, de tamaño mínimo, con solapamiento de genes. Por otro lado, los virus con células hospederas eucariotas tienden a comprimir su genoma ampliamente mientras el “core” es ensamblado en la cápside para que sólo la cantidad óptima sea empaquetado (Marintcheva 2018).

Las estrategias de empaquetamiento de los virus dependen de su tipo de genoma. Los virus con doble hebra de ADN usan un motor molecular con una estructura como carrete para el empaque de su genoma en la cápside. Los virus ARN o ADN de hebra simple emplean un mecanismo cooperativo, en el cual el empaquetamiento y ensamblaje de su genoma dentro de la cápside ocurrirá de forma simultánea. En algunos casos (Ortomixovirus y algunos bacteriófagos), la molécula de ARN forma bucles temporales que facilitan su interacción con las proteínas de la cápside (Chaitanya 2019).

Entre los virus de ARN(+) podemos destacar el SARS-COV 2, causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (por sus siglas en inglés). Este virus perteneciente a la familia Coronaviridae, del Grupo IV según la clasificación de Baltimore. Es un virus con envoltura lipídica que ha tomado relevancia en razón a la pandemia del COVID-19. A diferencia de los virus de tipo ARN(-), contiene un genoma no segmentado que codifica directamente para dieciséis proteínas no estructurales (Nsps), así como trece ORFs que codifican cuatro proteínas estructurales y nueve accesorias (Antezana Llaveta y Arandia-Guzmán 2020, Lam Cabanillas et al. 2021).

El mecanismo de patogenicidad seguido por el SARS-CoV-2 inicia con el reconocimiento de la proteína S (*spike*) por el receptor de la angiotensina 2 (ACE2) de la célula hospedera (selectividad de los tejidos diana). Posterior a la interacción antes mencionada, las membranas se fusionan y el ingreso del virus al citoplasma de la célula se da por endocitosis. Seguidamente, la nucleocápside se libera, dejando expuesto el genoma viral, el cual es directamente transcrito. La mayoría de genes virales codifica para enzimas asociadas a la replicación y transcripción, tales como la ARN polimerasa dependiente de ARN, helicasa, ribonucleasas, metiltransferasa y otras proteínas nsp con función desconocida (Pastrian-Soto 2020).

Por otro lado, los virus de tipo ARN doble hebra son un grupo amplio de virus que infectan diferentes hospederos, tanto vertebrados como invertebrados, así como bacterias y hongos. A diferencia del genoma de los virus de hebra simple sentido positivo, el de los virus de doble hebra es inerte y su replicación depende de la polimerasa viral presente en el complejo de ribonucleoproteínas. Su genoma puede ser segmentado o no, sin embargo, en la mayoría de estos virus, el genoma permanece dentro de la nucleocápside durante todo el ciclo viral para evitar la activación de los mecanismos de defensa celular del hospedero, tal como el silenciamiento de ARN, síntesis de interferón regulación de la traducción, etc (Arnold et al. 2021).

3.6.Genoma del TiLV

Este virus posee un genoma ARN sentido negativo de 10,323 nt, distribuidos en diez segmentos de diversa longitud (Figura 6), desde 465 nt hasta 1641 nt (Behera *et al.* 2018). Haciendo uso del programa ORFfinder (NCBI), podemos observar que existen diferentes ORFs predichos para cada segmento viral (considerando sólo AUG como codón de inicio). Sin embargo, de acuerdo al análisis realizado por Acharya *et al.* (2019), se cree que los 10 segmentos virales de TiLV podrían codificar para 14 diferentes polipéptidos, en base a su estabilidad, dinámica estructural y fluctuación residual de cada modelo obtenido por los autores con el programa de modelamiento de proteínas CABS-flex 2.0. Los segmentos 1 (Figura 7), 2 (Figura 8), 6 y 9 (Figura 9) podrían contener dos posibles ORFs codificantes cada uno, mientras que los otros segmentos, codificarían un único ORF. A la fecha, las proteínas codificadas por dichos segmentos siguen bajo la categoría de hipotéticas.

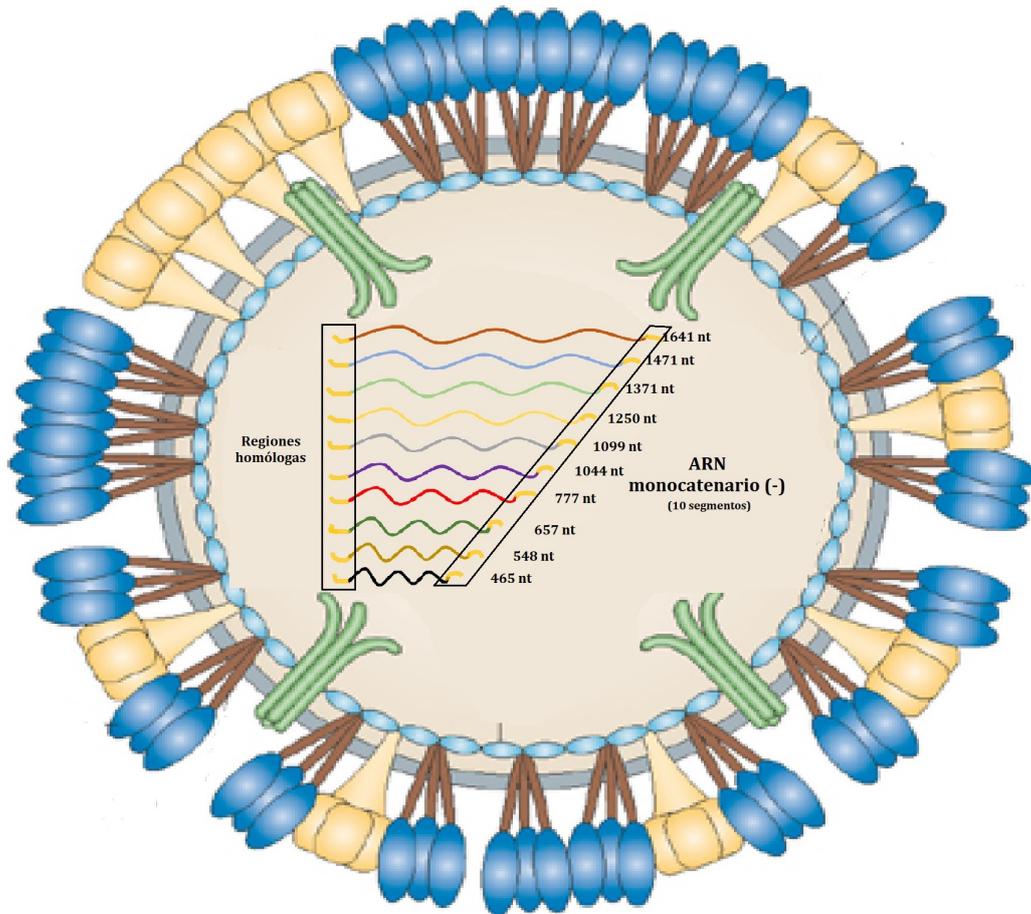


Figura 6: Representación genómica del TiLV a partir de un modelo de orthomyxovirus. Genoma compuesto por ARN monocatenario de sentido negativo dividido en diez segmentos virales. Nótese los extremos con regiones homólogas (encerrados en rectángulos negros) en todos los segmentos. Representación de proteínas, Hemaglutinina (azul), Neuraminidasa (amarillo), Proteína de exportación nuclear (verde). Modificado de ViralZone (<https://viralzone.expasy.org/223>).

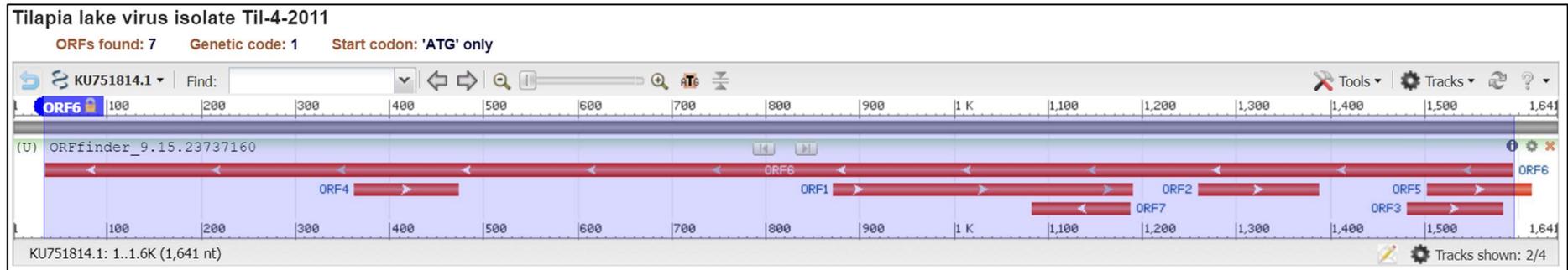


Figura 7: Predicción de ORFs en Segmento 1 del TiLV. Los dos posibles ORFs codificantes de proteínas en el segmento 1 (según Acharya et al. 2019) serían el ORF6 (sentido negativo, hacia la izquierda) y el ORF1 (sentido positivo, hacia la derecha). Fuente: ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) consultado con la secuencia KU751814.1.



Figura 8: Predicción de ORFs en Segmento 2 del TiLV. Los dos posibles marcos de lectura codificantes de proteínas (según Acharya et al. 2019) serían el ORF8 (sentido negativo, hacia la izquierda) y el ORF2 (sentido positivo, hacia la derecha). Fuente: ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) consultado con la secuencia KU751815.1.



Figura 9: Predicción de ORFs en Segmento 6 del TiLV. Los dos posibles marcos de lectura codificantes de proteínas (según Acharya et al. 2019) serían el ORF13 (sentido negativo, hacia la izquierda) y el ORF6 (sentido positivo, hacia la derecha). Fuente: ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) consultado con la secuencia KU751819.1.



Figura 10: Predicción de ORFs en el Segmento 9 del TiLV. Los dos posibles marcos de lectura codificantes de proteínas (según Acharya et al. 2019) serían el ORF9 (sentido negativo, hacia la izquierda) y el ORF13 (sentido negativo, hacia la izquierda). Fuente: ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) consultado con la secuencia KU751822.1.

El TiLV fue clasificado inicialmente dentro de los ortomyxovirus debido a los extremos complementarios de cada segmento que son conservados entre sí, característico de dicha familia (Figura 10). Sin embargo, fue posteriormente reclasificado como la única especie dentro de la familia Amnoonviridae, género *Tilapinevirus* y especie *Tilapia tilapinevirus* (Adams *et al.* 2017). Actualmente es el agente etiológico de una enfermedad altamente letal de tilapia, también referida inicialmente como “hepatitis sincitial de tilapia” en Ecuador o “Síndrome de la mortalidad de tilapia de un mes” en Tailandia, la cual se caracteriza por brotes masivos de mortalidad en peces de cultivo y silvestres (Kibenge y Godoy 2016).

Como se resume en la Tabla 2, el segmento 1 posee una débil homología con la subunidad PB1 del virus de la influenza C y se presume que codifica para la polimerasa de TiLV (Eyngor *et al.* 2014, Surachetpong *et al.* 2017, Aich *et al.* 2021) pero además, muestra fuerte homología con el virus Dhori, al igual que los segmentos 2, 4 y 5; los segmentos 6, 7 y 8 con el virus de influenza A, B y C y el segmento 3 posee una débil homología con el virus de la anemia infecciosa del salmón (Acharya *et al.* 2019), revelando además una larga historia de diversificación basal no estudiada (Thawornwattana *et al.* 2020).

Tabla 2: Relaciones de similitud entre el genoma del TiLV y otros ortomixovirus.

| Segmento | Similitud | Familia | Referencia |
|----------|------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| 1 | Subunidad PB1 – Influenza C | Ortomixoviridae | Eyngor <i>et al.</i> 2014 |
| 2, 4, 5 | Dhori | | Acharya <i>et al.</i> 2019 |
| 6 | Influenza A, C | | |
| 7, 8 | Influenza A | | |
| 3 | Anemia infecciosa del Salmón | | |

3.7. Mecanismos de infección

La infección por TiLV se da de individuo a individuo por transferencia física o a través del agua de cultivo. La transmisión puede ser horizontal (entre individuos que cohabitan un mismo espacio) o vertical (de padres a crías) (Aich *et al.* 2021), afectando inicialmente

el hígado y bazo y migrando posteriormente a los tejidos reproductivos (órganos reproductivos y huevos) y nervioso (cerebro).

Debido al hábito de alimentación de la tilapia, la cual se basa en una dieta omnívora donde el canibalismo es frecuente, se cree que la ruta intragástrica es la primera vía de infección ya que la ruta intraperitoneal necesita pasar la primera línea de defensa antes de ingresar en el cuerpo del hospedero (Pierezan *et al.* 2019). Además, se ha reportado la presencia del virus en la mucosa externa (piel) de individuos infectados (Eyngor *et al.* 2014), lo cual favorece la transmisión horizontal, principalmente en piscigranjas de cultivo intensivo, donde la densidad de siembra es bastante alta.

Los alevines y peces más pequeños son más susceptibles a la enfermedad en comparación a los adultos, que pueden resultar asintomáticos (Bacharach *et al.* 2016). Sin embargo, la transferencia del virus puede estar directamente correlacionada con el nivel de estrés de los mismos (Ferguson *et al.* 2014), factor crucial de desarrollo de la enfermedad, llevando al inicio de síntomas a 1 o 2 días post-infección (Liamnimitr *et al.* 2018).

3.8.Ciclo de replicación viral

La información respecto al mecanismo de infección por TiLV y su replicación viral es nulo. Sin embargo, debido a las características genómicas compartidas con varios ortomixovirus, como el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) y el virus de influenza (Kibenge y Godoy 2016), se supone un modelo semejante para el TiLV con algunas diferencias.

Como se indica en la Figura 11, el ciclo de replicación viral del ISAV inicia con la fijación sobre la célula hospedero mediante la hemaglutinina (HA) viral sobre los receptores de ácido siálico de la superficie epitelial del hospedero y la consecuente fusión de las membranas, permitiendo la internalización viral. Esta HA viral presente en los ortomixovirus causa, además, la aglutinación de los eritrocitos de la sangre de sus hospederos.

A diferencia del TiLV, donde no se observa aglutinación de eritrocitos en peces, se presume que los mecanismos de internalización viral emplearía procesos independientes a la presencia de proteínas de superficie con propiedades de hemaglutinación y, por tanto, el uso de distintos receptores a los de ácido siálico que aún no han sido identificados (Chengula *et al.* 2019).

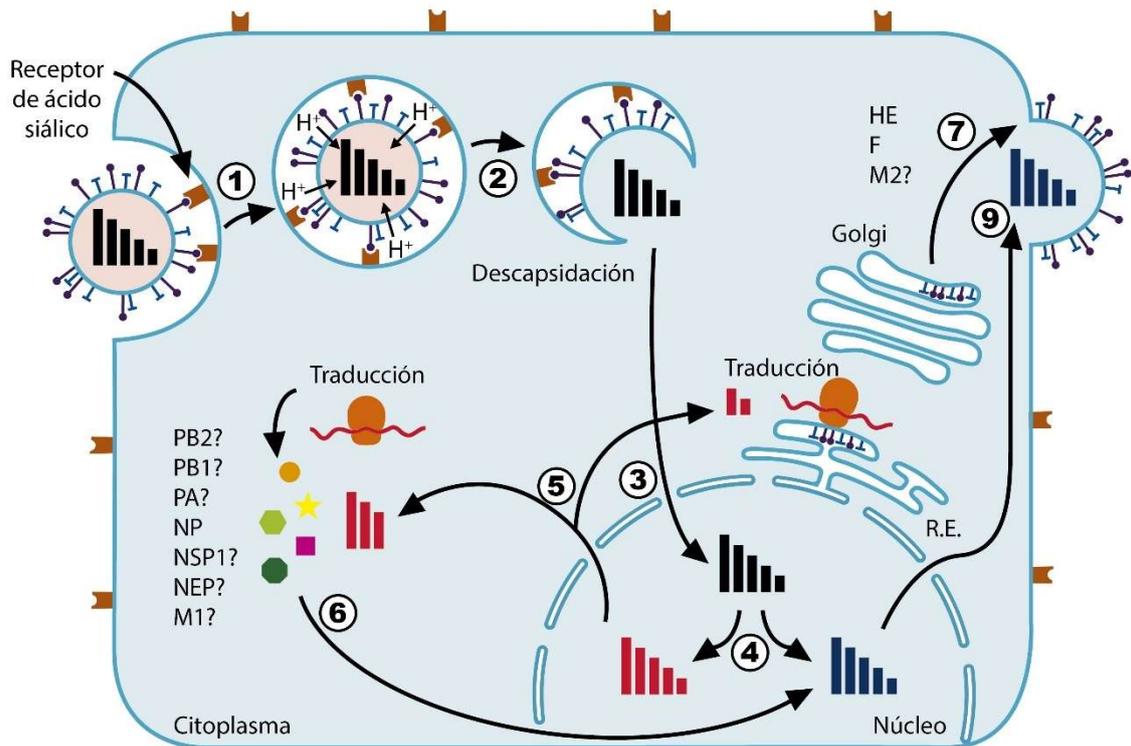


Figura 11: Representación esquemática de la infección del virus ISAV en una célula de pez 1: unión de la hemaglutinina viral (HA) con los receptores de ácido siálico de la célula hospedera. 2: penetración viral y activación de la bomba de protones (H^+) en el endosoma hacia el interior de la partícula viral mediada por canal de iones, con la subsecuente liberación del genoma viral en el citoplasma de la célula. 3: translocación del complejo de ribonucleoproteínas (RNP) virales al núcleo. 4: transcripción y replicación del genoma viral en el núcleo. 5: traducción de los transcritos virales en el citoplasma de la célula huésped. 6 - 7: transporte de las proteínas al núcleo y la membrana. 8: formación del complejo de RNP en el núcleo. 9: transporte del complejo RNP hacia las vesículas de la membrana plasmática. PB1, PB2, PA: subunidades de la polimerasa viral; NP: nucleoproteína; NSP1, NEP: proteínas de exportación nuclear; M1, M2: proteínas de la matriz viral; HE: Hemaglutinina esterasa; F: proteína de fusión viral. Figura modificada de (Cottet et al. 2011).

3.9. Respuesta inmunitaria

Aunque algunos estudios detallan los efectos a nivel de órganos y tejidos causados por el TiLV, muy pocos han descrito los cambios secuenciales durante el progreso de la infección tal como la penetración viral, la replicación local o la dispersión hacia órganos diana.

De acuerdo a lo descrito por Mugimba *et al.* 2020, las etapas secuenciales de la infección inician con la penetración del TiLV en los portales de entrada (células diana, principalmente del sistema gastrointestinal) y la replicación local, seguida de la dispersión a otros órganos (incluyendo el bazo e hígado). El establecimiento de la infección se detecta, entre otros, por receptores de reconocimiento de patrones intracelulares (principalmente TLR3 y TLR7 ubicados en endosomas). TLR7 reconoce el ARN viral de hebra simple mientras que el receptor TLR3 por ARN doble hebra y activa la vía NF- κ B, que conducen a una cascada de respuestas celulares como la expresión de citoquinas inflamatorias que modulan la migración de leucocitos a los sitios de infección. Luego, las células infectadas por virus secretan interferones (IFNs) y genes inducibles por IFN (ISG), como Mx, para limitar la replicación viral y producción de progenie. Experiencias anteriores (Mugimba *et al.* 2019) mostraron la expresión de IL-1 β y TNF α en respuesta a la infección por TiLV en tilapia gris y roja en el momento de la muerte, pero la cinética de estos genes durante la incubación y las etapas agudas de la infección por TiLV son desconocidos.

Por otro lado, posterior a los 7 días post-infección, los antígenos presentes en el huésped son reconocidos y procesados por el sistema innato por células presentadoras de antígenos (APC-macrófagos, células dendríticas y linfocitos B). Como resultado, los antígenos procesados por las células presentadoras de antígenos (APC) serán presentados al linfocito T, los cuales tienen la capacidad de reconocer el antígeno estrictamente en la presencia de un componente humoral (receptores de glicoproteínas) llamado Complejo de Histocompatibilidad Mayor (MHC) (Biller-Takahashi y Urbinati 2014). Después del reconocimiento, las células T secretan citoquinas, las cuales actúan sobre la activación de otras células, como los linfocitos B (responsables de la producción de anticuerpos), linfocitos citotóxicos, macrófagos y otras.

3.10. Clonación

La clonación ha facilitado la producción de una gran cantidad de proteínas de interés (Brudeseth *et al.* 2013, Ferrer-Miralles *et al.* 2015), que de otra forma, sería laborioso y costoso producirlas (como es el caso de las proteínas virales). Por ello, gracias a su rápido y fácil crecimiento, bacterias y levaduras son considerados candidatos ideales para estudios de clonación y expresión de genes.

Sin embargo, los sistemas tradicionales de clonación (Figura 12) (Chen 2012, Rosano y Ceccarelli 2014) involucran, la construcción de vectores basados en numerosos procesos de ligación y restricción con diversas enzimas (Bertero *et al.* 2017, Cohen *et al.* 1973), convirtiéndolos en procesos de alto consumo de tiempo y recursos económicos. Además, a pesar de la alta eficiencia que puede ser alcanzada por éstos sistemas, la síntesis de péptidos recombinantes de más de 200 residuos puede resultar problemático debido a que son frecuentemente inestables o pueden formar cuerpos de inclusión insolubles (Balamurugan *et al.* 2010).

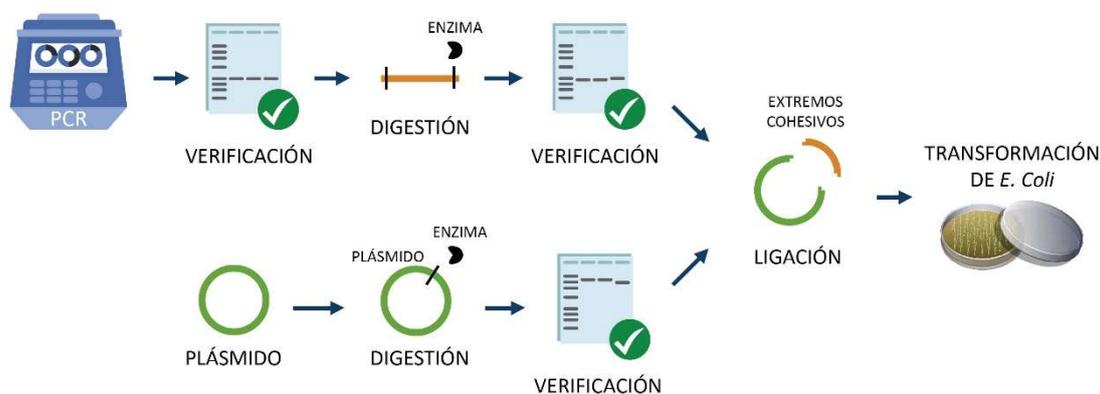


Figura 12: Sistema tradicional de construcción de plásmidos recombinantes. Este procedimiento de clonación involucra el uso de enzimas de restricción para la generación de extremos cohesivos por cada inserto y su plásmido, seguido de un proceso de ligación mediado por ligasas. Finalmente, los vectores son recuperados en *E. coli* posterior a su transformación. Fuente: Propia

Alternativamente, otras técnicas de clonación se han desarrollado; tal como la “Clonación TA”, donde se liga directamente un extremo terminado en Adenina (A) del inserto (proporcionado por la *Taq* polimerasa durante la PCR) con un vector linealizado con extremo terminado en Timina (T) (Bertero *et al.* 2017, Celie *et al.* 2016). Sin embargo, esta técnica requiere una inversión mediana de dinero, contar con diversos vectores y su aplicación para más de un fragmento resulta dificultoso.

Otra técnica comúnmente usada es la “clonación Gateway”, un sistema patentado de Life Technologies/Invitrogen® basado en las reacciones de integración del fago λ en el genoma de *E. coli*. Este sistema permite la recombinación *in vitro* de un inserto, contenido en un vector donador, a través de dos mezclas de enzimas (clonasas BP y LR) que realizan

diferentes tipos de reacciones de recombinación en sitios específicos (*attP* y *attB*), mucho más largos que los de restricción, en diversos vectores receptores. Este sistema tiene la desventaja de requerir una inversión alta de dinero, además de la compra de enzimas y vectores compatibles (Reece-Hoyes y Walhout 2018, Bertero *et al.* 2017).

Recientemente, la herramienta CRISPR-Cas también se ha unido a las metodologías de clonación, permitiendo la unión de un fragmento de ADN (inserto) de hasta 3,500nt a través de un corte específico en el ADN receptor mediado por un ARN guía y una enzima caspasa (Cas9). Posteriormente, el inserto es unido mediante la vía de reparación dirigida por homología (HDR) a través de regiones homólogas flanqueantes a los sitios de corte CRISPR (Arbab *et al.* 2015, Shola *et al.* 2020). Si bien esta técnica permite una integración altamente eficiente en corto tiempo, también requiere una inversión alta de dinero y conocimiento de la técnica.

3.11. Clonación *in vivo* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Respecto a los sistemas de clonación, tanto bacterias y levaduras poseen varias ventajas en su uso debido al rápido crecimiento y bajo costo de masificación y mantenimiento en laboratorio. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la ingeniería genética resulta más fácil de aplicar en comparación a otros eucariotas, debido a su corto genoma (1.2×10^6 nt) bastante estudiado. Además, a través de la delección o integración de genes específicos en el cromosoma de la levadura, donde se pierde o se gana, respectivamente, la función de genes específicos de interés, la convierten en una herramienta útil en el análisis de expresión de genes exógenos (Zhao 2017). Ejemplo de ello es el aporte en el estudio de las funciones génicas involucradas en la apoptosis y su regulación en levadura, aportando en la investigación del cáncer, enfermedades neurodegenerativas y síndromes de deficiencia autoinmune (Galardini *et al.* 2019, Madeo *et al.* 2002), que, de haberse estudiado en líneas celulares humanas, hubiera tomado más tiempo y recursos.

Así mismo, estos organismos eucariotas unicelulares pueden reconocer promotores y señales de poliadenilación de genes de organismos superiores (incluidos mamíferos), extendiendo su uso en diversas aplicaciones (Zhao y Lieberman 1995).

A diferencia de las técnicas descritas anteriormente, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* podemos tomar ventaja de la vía de reparación de ruptura del ADN mediante recombinación homóloga (llamada también “clonación *in vivo*”) y reconocida como una de las más eficientes en la construcción de plásmidos libres de errores (Kitazono 2009).

Esta metodología permite la clonación de uno o más fragmentos de diferentes longitudes en un vector sin necesidad de enzimas de restricción y en un solo paso de forma simple y económica, pero muy eficiente (Eckert-Boulet *et al.* 2011, Kitazono 2011).

La clonación *in vivo* se viene usando con bastante eficiencia en la producción de pruebas de diagnóstico (Balamurugan *et al.* 2010, Upadhyay *et al.* 2009, Shehata *et al.* 2012) y la producción de antígenos (Kim y Kim 2017, Kumar *et al.* 2018), con aplicaciones cada vez más frecuentes en el sector acuícola (Toranzo *et al.* 2009) debido a que las enfermedades infecciosas en especies de cultivo se han convertido en un factor limitante para su intensificación (Pérez-Sánchez *et al.* 2018).

Otra de las virtudes de la levadura en su uso como sistema de expresión heteróloga es la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales en las proteínas sintetizadas, lo cual es un mecanismo conservado en eucariotas mayores pero ausente en procariotas (Luu *et al.* 2017), permitiendo obtener proteínas con estructura y funcionalidad más semejante a la de organismos mayores.

Si bien algunos ensayos en sistemas bacterianos para la expresión heteróloga de antígenos virales (Lei *et al.* 2015, Liu *et al.* 2015, Lei *et al.* 2015, Ortega Ascencios *et al.* 2016) han sido desarrollados, los sistemas basados en la levadura *S. cerevisiae*, han mostrado mejores resultados en la producción de metabolitos y proteínas incluso como vacuna oral de células completas (Bal *et al.* 2018, Allnut *et al.* 2007, Cho *et al.* 2017, Choi *et al.* 2013).

La técnica de clonación ha facilitado la expresión de proteínas en sistemas heterólogos de mayor rendimiento. La simplicidad y versatilidad del método de clonación *in vivo* en levadura se basa en regiones homólogas (15-60 nt) compartidas entre los extremos del inserto o insertos y el plásmido linealizado (Kitazono 2009, Oldenburg 1997), y es compatible con casi cualquier plásmido (Joska *et al.* 2014, Iizasa y Nagano 2006) e insertos tanto naturales como sintéticos (van Leeuwen *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2019).

En la Figura 13 se esquematizan las principales metodologías de clonación; obsérvese que, la clonación *in vivo* no requiere de uso de enzimas de restricción ni procesos de modificación de los insertos. (Imagen tomada y modificada de NEB, disponible en <https://www.neb-online.fr/en/cloning-synthetic-biology/>).

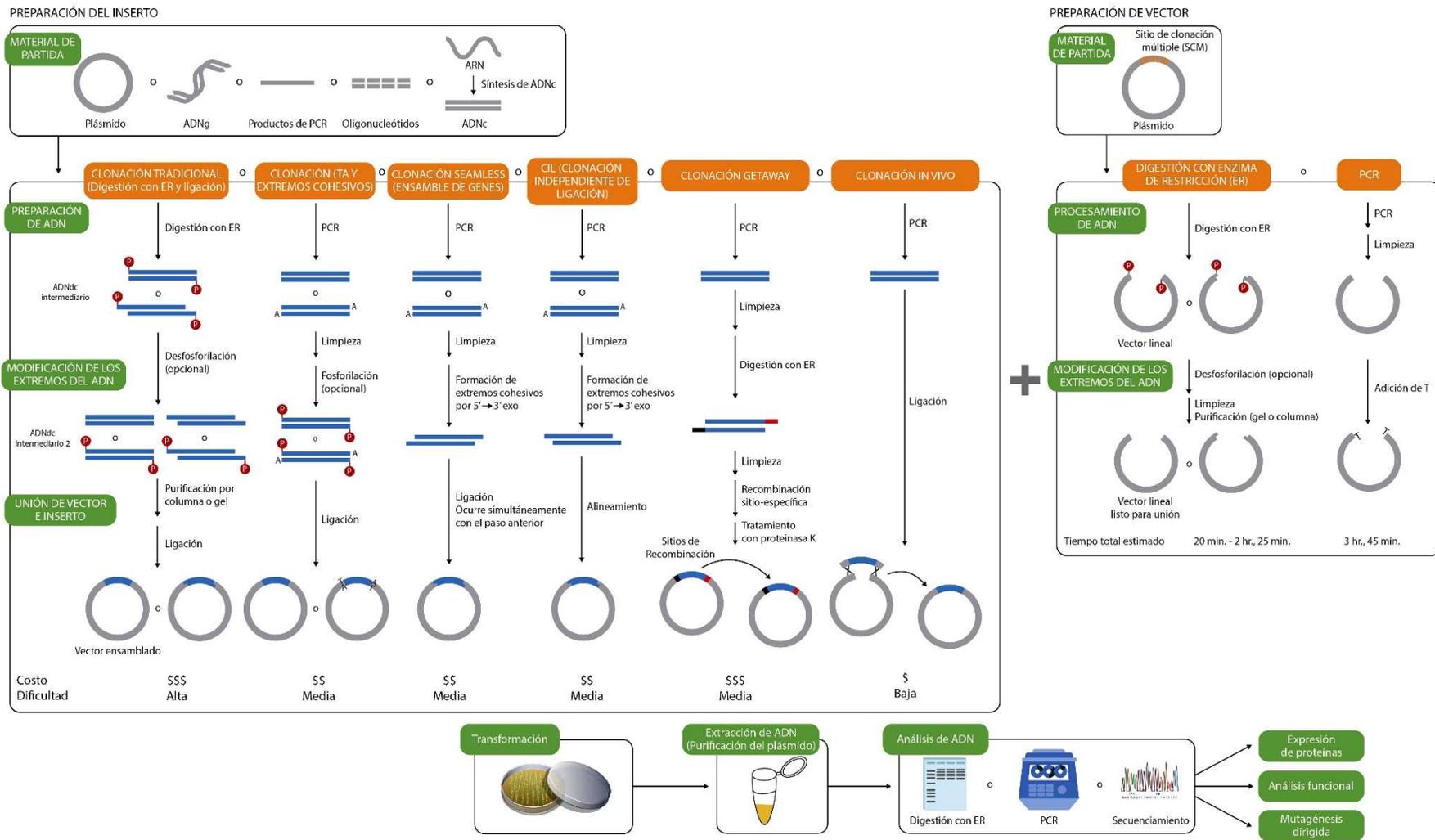


Figura 13: Comparación entre las principales metodologías de clonación *in vitro* e *in vivo*. Modificado de NEB (<https://www.neb-online.de/en/cloning-synthetic-biology/>)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo de investigación siguió las siguientes etapas:

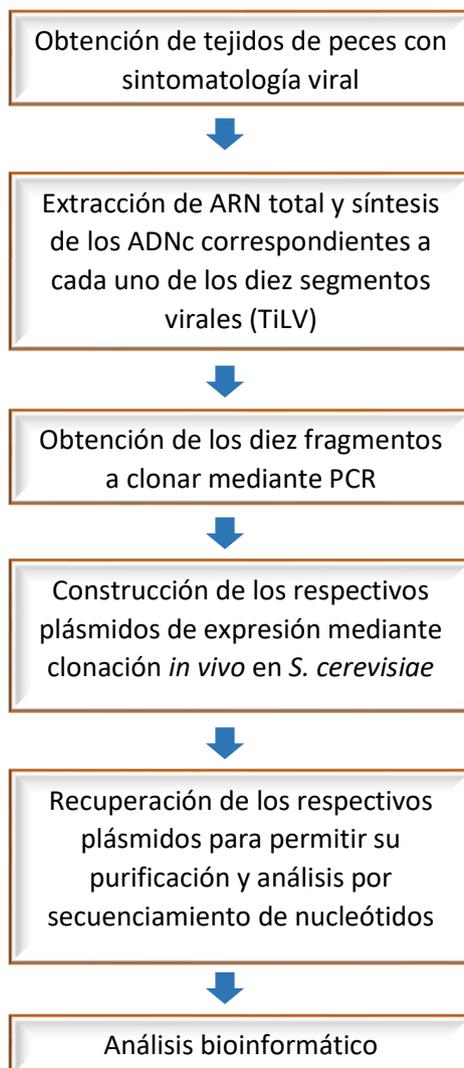


Figura 14: Esquema metodológico para el desarrollo de la tesis

3.12. Obtención de tejidos de tilapia con sintomatología viral

Se tomaron muestras de hígado, riñón, bazo y cerebro de individuos con sintomatología viral (nado errático, melanismo, exoftalmia, protrusión abdominal, heridas externas) provenientes de zonas de cultivo de Piura y Tarapoto con eventos de mortalidad masiva reportada (Figura 15). Los tejidos fueron extraídos por disección con bisturíes estériles y los tejidos colectados fueron conservados en solución estabilizante (25mM citrato de sodio, 10mM EDTA, 70 por ciento de sulfato de amonio, pH 5.2, preparada con agua

ultra pura) (Figura 16). Además, tejidos de individuos sanos fueron colectados del Centro de Investigación y Producción Piscícola (CINPIS-UNALM) como controles negativos. Las muestras fueron conservadas en cadena de frío hasta su arribo al laboratorio, donde se conservaron a -80°C .



Figura15: Poza de cultivo de alevines de tilapia con presencia de TiLV. Nótese la gran cantidad de alevines (3-5 cm) muertos flotando en la superficie del cuerpo de agua.



Figura 66: Colecta de tejidos de tilapia proveniente de una poza de cultivo con brotes de mortalidad. Se muestra un espécimen con sintomatología viral por TiLV (congestión del peritoneo, petequias en el hígado, hepatomegalia y esplenomegalia).

3.13. Características del plásmido de expresión pEGH

El plásmido pEGH (Figura 17) es un plásmido usado frecuentemente en la síntesis de proteínas de fusión con GST en *S. cerevisiae* (Pierce y Wendland 2009), sin embargo, gracias a sus elementos de expresión mixta, puede mantenerse y replicarse tanto en levadura como en *E. coli*.

El plásmido contiene los genes marcadores de auxotrofia *URA3* y *leu2-d*. El primero codifica para la orotidina 5-fosfato descarboxilasa (ODCase), una enzima involucrada en la síntesis de *ново* de ribonucleótidos de pirimidina, mientras el segundo interviene en la síntesis de la beta-isopropilmalato deshidrogenasa, la enzima que cataliza el tercer paso en la biosíntesis de leucina respectivamente (Pierce y Wendland 2009, Müller et al. 2016). Dichos marcadores auxotróficos favorecen la selección de transformantes, por complementariedad génica, en cepas con las vías metabólicas esenciales interrumpidas, de síntesis de uracilo y leucina respectivamente, restableciendo su funcionalidad e independizándola de la suplementación del medio.

Debido a la presencia del origen de replicación 2μ en el plásmido pEGH, el número de copias por célula puede llegar a 100 (Chan et al. 2013, ERHARTt y Hollenberg s. f.), con

una expresión bastante alta y controlada sin efecto negativo sobre el crecimiento de célula huésped (Pierce y Wendland 2009).

El plásmido pEGH contiene los promotores GAL (inducible por galactosa) y citocromo oxidasa (CYC1). El primero, es un promotor híbrido que posee las secuencias promotoras de los genes *GAL1* y *GAL10* de *Saccharomyces cerevisiae*, adyacentes y transcritas de forma divergente. En presencia de galactosa, la expresión de la proteína de interés es inducida, mientras que en presencia de glucosa, la expresión se reprime (Johnston' y Davis 1984). El segundo promotor presente en el plásmido pEGH es el promotor CYC1, un promotor constitutivo asociado a la expresión de la isoforma 1 de Citocromo Oxidasa, la cual es usada en la expresión heteróloga activada por oxígeno y reprimida por glucosa (Martens et al. 2001).

Inmediatamente después de las secuencias promotoras se encuentran el gen *gst* y una región codificante de polihistidinas (x6 His). El primero codifica para la proteína truncada Glutation S-transferasa (GST), que permite su detección por anticuerpos anti-GST por Western Blot (Pierce y Wendland 2009) mientras que la segunda sintetiza seis residuos seguidos de histidinas, que facilitan la posterior purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad mediada por unión a metales (níquel o cobalto) (Booth et al. 2018).

Seguido a las etiquetas de GST y x6 His, encontramos el sitio multicorte del plásmido, una región con las secuencias de reconocimiento de diferentes enzimas de restricción empleadas para la linealización del plásmido, flanqueada por las regiones reconocidas por los iniciadores pEGH9145FW y 3bRVpEGH, usados en la verificación del inserto.

El gen de resistencia a ampicilina *ampR* también está presente en el plásmido y permite la selección de transformantes de *E. coli* en un medio de cultivo suplementado con este antibiótico.

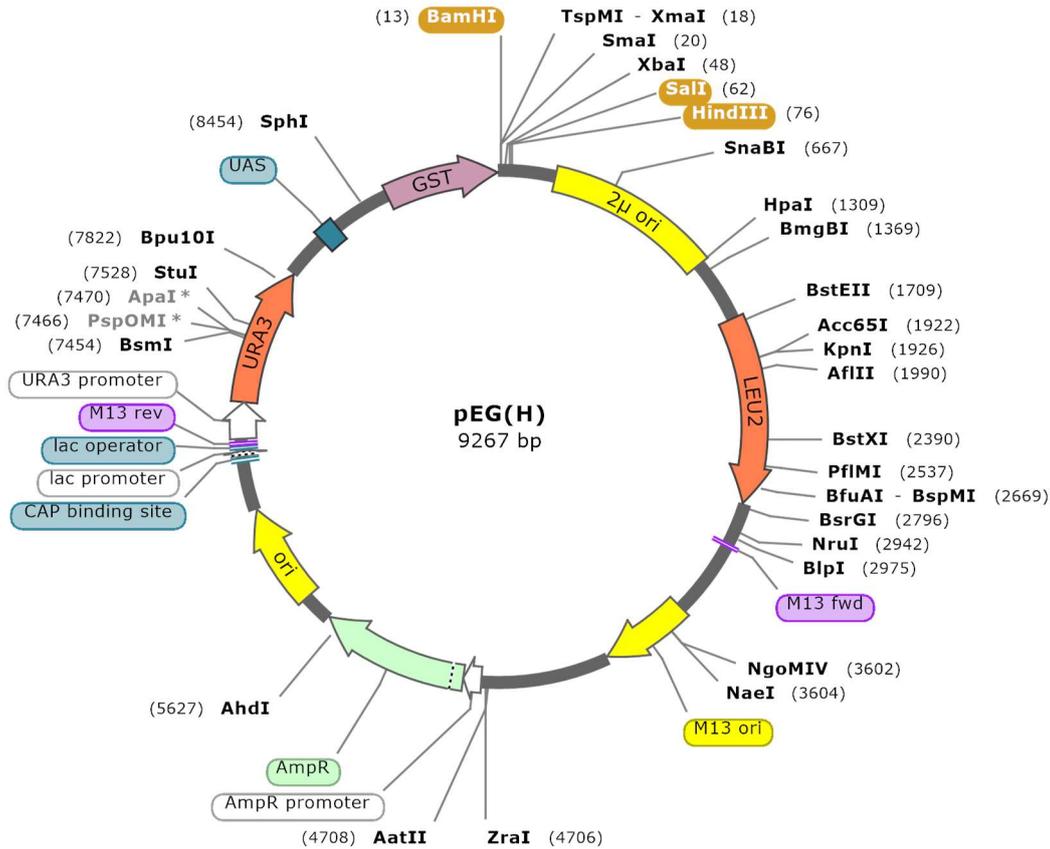


Figura 17: Mapa del plásmido pEG(H). Este plásmido cuenta con el elemento de división multicopia 2μ de levadura (rectángulo amarillo) y el origen de replicación M13 (flecha amarilla). El primero (2μ), es un elemento de ADN multicopia relativamente pequeño que reside en el núcleo de la levadura en un número de hasta 100 copias por célula haploide; mientras el segundo (M13 ori), es un ori derivado de fago que permite la replicación y el empaquetamiento de ADN hebra simple en partículas de fago. *Bam*HI y *Hind*III (en dorado): son los sitios de restricción usados para la digestión del plásmido y posterior recombinación con el inserto. *Sal*I (en dorado): usado para la linealización del plásmido. (Gráfico obtenido con SnapGene 7.0.3)

3.14. Diseño de iniciadores

El diseño de iniciadores se basó en la homología de los segmentos virales de TiLV. Para la síntesis de la primera hebra de ADN complementario, se aprovechó la región homóloga presente en los extremos de todos los genes virales para el diseño de un único iniciador. Posteriormente, para la amplificación de cada segmento por PCR, iniciadores internos específicos a cada gen fueron diseñados en función a las secuencias publicadas de genomas del TiLV en la base de datos GenBank de acuerdo a la Tabla N°3. Se tomó como

referencia las secuencias publicadas para Israel y Tailandia como centros de origen del brote viral (Eyngor et al. 2014, Surachetpong et al. 2017).

Tabla 3: Números de acceso (GenBank) de las secuencias virales de TiLV empleadas en el diseño de iniciadores

| Segmento | País | | |
|-------------|------------|------------|------------|
| | Israel | Tailandia | Tailandia |
| SEGMENTO 1 | KU751814.1 | KX631921.1 | MH319378.1 |
| SEGMENTO 2 | KU751814.1 | KX631921.1 | MH319378.1 |
| SEGMENTO 3 | KU751815.1 | KX631922.1 | MH319379.1 |
| SEGMENTO 4 | KU751816.1 | KX631923.1 | MH319380.1 |
| SEGMENTO 5 | KU751817.1 | KX631924.1 | MH319381.1 |
| SEGMENTO 6 | KU751819.1 | KX631926.1 | MH319383.1 |
| SEGMENTO 7 | KU751820.1 | KX631927.1 | MH319384.1 |
| SEGMENTO 8 | KU751821.1 | KX631928.1 | MH319385.1 |
| SEGMENTO 9 | KU751822.1 | KX631929.1 | MH319386.1 |
| SEGMENTO 10 | KU751823.1 | KX631930.1 | MH319387.1 |

FUENTE: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=tilapia+lake+virus>

El diseño se realizó mediante el software Primer-BLAST (NCBI) configurado con las condiciones de reacción deseadas (temperatura de hibridación, porcentaje de GC, astringencia, ubicación). La verificación de los modelos físicos de comportamiento de los iniciadores candidatos fue realizada mediante el software OligoAnalyze Tool (IDT), donde se analizó los potenciales dímeros de cada secuencia. Los iniciadores usados para la generación de los fragmentos a ser clonados incluyeron regiones externas homólogas con los extremos del plásmido de 44 a 48 nucleótidos (Figura 18), respetando siempre los marcos de lectura de cada segmento viral.

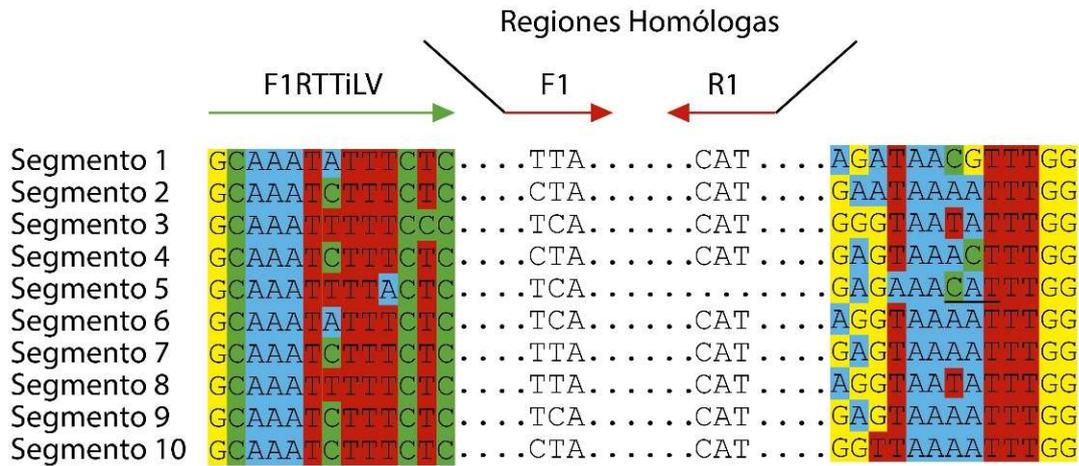


Figura 18: Diseño de los iniciadores para la obtención de los diez fragmentos a clonar a partir del ARN viral del TiLV. Se muestra un alineamiento de los diez segmentos virales clonados, mostrando los respectivos anticodones de inicio y término de cada ORF. Se asignó un color específico a cada tipo de base para destacar las regiones de homología en los extremos de cada segmento viral. Nótese que se muestran los respectivos anticodones (CAT para el de inicio), debido al sentido negativo del genoma viral.

El iniciador F1RTTiLV (en verde), usado para la transcripción reversa del ARN viral y lograr la síntesis de cada ADNc por RT-PCR, se ubica en la región de homología compartida por los diez segmentos. Dos tipos de iniciadores internos (en rojo) fueron diseñados para cada segmento viral, el iniciador denotado como R1 sobre el anticodón de inicio (CAT) y el iniciador F1 sobre los de término. A cada uno de estos iniciadores internos se le adicionó una secuencia homóloga de 45 nucleótidos (en negro) a los extremos del plásmido pEGH necesarios para la clonación *in vivo*. Para dar direccionalidad al inserto, la región homóloga previa al sitio de corte por *Sall* en el plásmido, fue añadida al extremo del iniciador R1, mientras que la región homóloga al extremo posterior al sitio de corte fue añadida al iniciador F1.

Se confirmó que el marco de lectura de los insertos sea igual al de los codones de histidina y al de la etiqueta GST, a fin de que la proteína recombinante sea sintetizada correctamente fusionada al extremo C-terminal del péptido GST.

3.15. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario

La extracción de ARN de las muestras de tejidos de tilapia se realizó mediante el kit de extracción Quick-RNA MiniPrep Plus (Zymo Research) de acuerdo a las

recomendaciones del fabricante. La calidad del ARN resultante fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa (1.2 por ciento). Las muestras con óptimas condiciones de calidad fueron sometidas a la síntesis de la primera hebra de ADN complementario, haciendo uso del kit OneScript Plus RT-PCR (amb) con los iniciadores F1RTTiLV o F2RTTiLV (Tabla 4) con tratamientos a 42 °C por 60 min seguido de 70 °C por 10 min.

3.16. Amplificación de los ADNc virales mediante PCR

Todos los ADNc virales fueron amplificados mediante PCR convencional, usando los iniciadores específicos previamente diseñados para cada gen, 2 µL de ADNc como plantilla y la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher). Para la amplificación de los segmentos 1 a 3, el protocolo de PCR empleado fue el siguiente: un paso de desnaturalización a 98 °C por 30s, seguido de 35 ciclos de 98 °C por 10s, 58 °C por 40s, 72 °C por 50s y una extensión final de 72 °C por 5min. En los otros casos, el protocolo fue el siguiente: un primer paso de desnaturalización a 98 °C por 30s, seguido de 25 ciclos de 98 °C por 10s, un gradiente de hibridación desde 58 °C hasta 72 °C por 30s (+0.56 °C por ciclo), 72 °C por 40s seguidos de 10 ciclos de 98 °C por 30s, 72 °C por 50s y una extensión final de 72 °C por 5min. La longitud y calidad de los productos amplificados fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa (0.8por ciento).

3.17. Clonación *in vivo* en levaduras

La cepa de levadura *S. cerevisiae*, con fenotipo auxótrofo para uracilo (-URA), fue empleada en la transformación con los productos de PCR de cada ADNc viral y el plásmido pEGH (Figura 177) previamente linealizado y defosforilado con las enzimas de restricción *Sall* y fosfatasa alcalina (Promega) respectivamente.

La clonación *in vivo* fue optimizada a partir del protocolo previamente descrito por Kitazono (2009). El plásmido pEGH se mezcló con cada producto de PCR obtenido de la amplificación de los ADNc en relación 1:1 a 1:6 moles hasta una cantidad máxima de 200 ng de ADN total. La transformación de las levaduras fue realizada por choque térmico previo tratamiento con acetato de litio y polietilenglicol (PEG3350) de acuerdo al siguiente proceso: cultivos (5 mL) con crecimiento por aproximadamente 14 horas fueron diluidos 5 a 10 veces en medio de cultivo líquido YPD e incubados a 30 °C hasta alcanzar un OD_{600nm} de 0.6 a 0.8. En este punto, las células fueron colectadas por centrifugación, lavadas y resuspendidas en una solución de acetato de litio y buffer TE. Posteriormente, se mezclaron alícuotas de esta suspensión de células (350 µL/muestra) con 10 µL de ADN

de esperma de salmón hervido y sonicado (10 mg/mL), 1 mL de PEG3350 50 por ciento en acetato de litio/buffer TE y la mezcla del plásmido digerido con cada ADNc amplificado previamente. La mezcla fue incubada por 30 min a temperatura ambiente con agitación constante, seguida del choque térmico a 42°C por 20 min. Los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y las células fueron colectadas por centrifugación, las cuales se resuspendieron posteriormente en medio no selectivo YPD e incubados a 30°C por 1 hora, para su recuperación. Adicionalmente, se incluyó un control de recombinación (conteniendo sólo el plásmido linealizado) y un control de transformación (conteniendo el plásmido sin digerir). La selección de transformantes se realizó por siembra en superficie en medio sólido sintético carente de uracilo con incubación a 30 °C por 3 a 4 días.

3.18. Extracción de ADN total de transformantes de levadura y verificación de la presencia de insertos esperados

Los transformantes de levadura fueron cultivados en medio líquido sintético carente de uracilo para la extracción del ADN total. El método de extracción empleado (Guthrie & Fink, 2002) se basó en la resuspensión del paquete celular con 200 µL de buffer de lisis (1.2 por ciento de SDS, 0.1M NaCl, 10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA) y su mezcla con 0.5 volúmenes de perlas de vidrio (Ø 1mm) y 200 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla fue agitada vigorosamente en un mezclador de vórtice por 2 minutos, a fin de facilitar la ruptura celular por las perlas de vidrio y la desnaturalización de las proteínas por el fenol. Los ácidos nucleicos en la fase acuosa fueron recuperados por centrifugación a máxima velocidad por 5 minutos, y luego precipitados por la adición de 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10M y 2 volúmenes de etanol helado. El precipitado de ácidos nucleicos fue recuperado por centrifugación, lavado tres veces con etanol 90por ciento (V/V) y resuspendido en 50 µL de buffer TE.

La confirmación de la presencia del inserto en el plásmido se realizó por PCR con los iniciadores pEGH9145FW y 3bRVpEGH, flanqueantes a la zona de recombinación del mismo, y 1 µL de ADN total de levadura como plantilla. La reacción de PCR se llevó a cabo bajo el siguiente programa: un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 58°C por 40s, 72°C por 90s y una extensión final de 72°C por 5 min. La longitud de los productos de PCR esperados fue verificada por electroforesis en gel de agarosa (0.8 por ciento).

3.19. Recuperación y amplificación de plásmidos en *Escherichia coli*

Los ADNs totales de los transformantes de levadura, que fueron confirmados por poseer el inserto de tamaño esperado, fueron usados en la recuperación del plásmido mediante transformación de células de *E. coli* por choque térmico. En resumen, 10 μ L de ADN total de levadura fue mezclado con una alícuota (40 μ L) de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α previamente preparadas y conservadas a -80 °C hasta su uso. Se realizó el choque térmico de las células con el ADN a 42 °C por 90s y 1 mL de medio LB fue agregado a cada tubo de transformación, seguido de un paso de recuperación a 37° C por 1h. Finalmente, las células previamente transformadas fueron sembradas por esparcimiento en medio selectivo sólido (LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL). Colonias de transformantes de cada placa fueron recuperadas y purificadas. La verificación de la presencia del plásmido con el inserto fue realizada por PCR con las condiciones descritas anteriormente.

3.20. Secuenciamiento

Dos plásmidos recuperados para cada segmento viral fueron secuenciados (Macrogen) con los iniciadores pEGH9145FW y 3bRVpEGH. La secuencia consenso para cada gen fue comparada con las secuencias reportadas para TiLV en la base de datos (GeneBank-NCBI).

3.21. Análisis bioinformático

Las lecturas resultantes del secuenciamiento de los plásmidos fueron alineados con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7 (Mega7) (Tamura *et al.* 2013) y la secuencia consenso fue comparada con la base de datos de TiLV reportada en el banco de genes (GenBank - NCBI) a fin de establecer las relaciones de similitud con las mismas.

El análisis filogenético se realizó bajo la comparación de nuestra secuencia con 21 secuencias virales completas reportadas en el GenBank de diferentes países del mundo, de forma concatenada segmento a segmento. Para ello, cada una de las secuencias fue delimitada en la longitud del ORF respectivo (limpieza de terminaciones) y su concatenación se realizó con el programa CIPRES Science Gateway V. 3.3 (XSEDE) seguido del análisis bayesiano de las comparaciones de los posibles árboles filogenéticos con el programa BEAST (versión 1.8.4) y el gráfico de los árboles fue realizado mediante

su interface gráfica BEAUTi. Finalmente, modificaciones de estilo en los árboles filogenéticos fueron realizados con el programa TreeView v1.6.

IV. RESULTADOS

4.1. Diseño de iniciadores

Se diseñaron 12 pares de iniciadores (Tabla 4), de los cuales el primer par (F1RTTiLV y F2RTTiLV5) corresponde a las regiones compartidas en los extremos de cada segmento viral y que sirvieron en la síntesis de la primera hebra de ADN complementario por RT-PCR. Debido al polimorfismo presente en la posición 10 (T>A) entre todos los segmentos y el segmento 5, y a fin de mantener el grado de degeneración de los iniciadores, el F2RTTiLV5 varió en este nucleótido en relación al F1RTTiLV para su uso sólo en la transcripción reversa de dicho segmento.

Diez pares de iniciadores adicionales, específicos para cada segmento viral incluyeron la región homóloga al plásmido y fueron optimizados exitosamente en la generación de cada inserto. Finalmente, un último par de iniciadores permitió el secuenciamiento de los plásmidos alrededor de la zona de inserción del mismo (sitio multicorte).

Tabla 4: Secuencias de los iniciadores utilizados

| Iniciador | Sequence (5'->3')* | Segmento | Propósito |
|------------------|---|-----------------|------------------|
| F1RTTiLV | GCA AAT ITT TCY C | Todos | RT-PCR |
| F2RTTiLV5 | GCA AAT ITT ACY C | 5 | RT-PCR |
| Fw2TiLV1IVC | GATCGTCAGTCAGTCACGATGAATTAAGCTTGAGCTCGAGTCGAATAGTTAAAGTTTGTGG GTTGTT | 1 | Clonación |
| RvTiLV1IVC | AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCCATGTGGGCATTTCAA GAAGGA | 1 | |
| FwTiLV2IVC | GATCGTCAGTCAGTCACGATGAATTAAGCTTGAGCTCGAGTCGAATCTACTGATTTAGATC CATATTTTCC | 2 | Clonación |
| Rv2TiLV2IVC | AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCC ATGAGTCARTTTGRGAARTCAT | 2 | |
| F1TiLV3IVC | GATCGTCAGTCAGTCACGATGAATTAAGCTTGAGCTCGAGTCGATYATCTCGCAAATGGGT GTACT | 3 | Clonación |
| R1TiLV3IVC | AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCCATGGACTCGCGGTTY GCA | 3 | |
| F1TiLV4IVC | GATCGTCAGTCAGTCACGATGAATTAAGCTTGAGCTCGAGTCGAACT TCG TTG CCT ATC TYC CAA | 4 | Clonación |
| R1TiLV4IVC | AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCCATG GTG AGA ACT ACA AAG ACT AGT | 4 | Clonación |
| F1TiLV5IVC | GATCGTCAGTCAGTCACGATGAATTAAGCTTGAGCTCGAGTCGAAAG GAT CAA GAT AAT GGA AGC A | 5 | Clonación |
| R1TiLV5IVC | AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCCATG TTT CTC TTA TCT CAG ACT CCA | 5 | |

| Iniciador | Sequence (5'->3')* | Segmento | Propósito |
|------------------|--|-----------------|------------------|
| F1TiLV6IVC | GATCGTCAGTCAGTCACGATGAATTAAGCTTGAGCTCGAGTCGATCACATGTATTTATTGA TTTTACAGCA | 6 | Clonación |
| R1TiLV6IVC | AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCCATG CAT TTT TAT CTA CAG GAT TYT CC | 6 | |
| F1TiLV7IVC | GATCGTCAGTCAGTCACGATGAATTAAGCTTGAGCTCGAGTCGATTAGAGTTCAAHGTG ATTCCCT | 7 | Clonación |
| R1TiLV7IVC | AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCCATG TCC TAC AAG ATT GGT GAG | 7 | |
| F1TiLV8IVC | GATCGTCAGTCAGTCACGATGAATTAAGCTTGAGCTCGAGTCGATTATTTAAGCATTTTAC GGAA | 8 | Clonación |
| R1TiLV8IVC | AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCCATGGCTCAAATRCCA ACA | 8 | |
| F1TiLV9IVC | GATCGTCAGTCAGTCACGATGAATTAAGCTTGAGCTCGAGTCGACCTCATAAAGTTYTATC GCC | 9 | Clonación |
| R1TiLV9IVC | AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCCT TTT TCC GCT TGG TGA TG | 9 | |
| F1TiLV10IVC | GATCGTCAGTCAGTCACGATGAATTAAGCTTGAGCTCGAGTCGACTAAGACTGCACGTCT AGAGA | 10 | Clonación |
| R1TiLV10IVC | AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCCATGAGTGTGGCAGAT TATTTGTC | 10 | |
| pEGH9145FW | GACCCAATGTGCCTGGATGCGTTC | pEGH | Secuenciación |
| 3bRVpEGH | ATCGTCAGTCAGTCACGATG | pEGH | Secuenciación |

4.2.Extracción de ARN y obtención de los fragmentos a clonar

La calidad del ARN extraído de los individuos con sintomatología viral y control fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa, mediante la presencia de las bandas de ARN 28S y 18S ribosomales (Figura 19).

Los fragmentos a clonar, correspondientes a cada segmento viral, fueron confirmados de acuerdo al tamaño esperado evaluado por electroforesis en gel de agarosa. Los 10 insertos correspondientes a cada segmento viral fueron amplificados por PCR y empleados en la clonación *in vivo* (Figura 20).

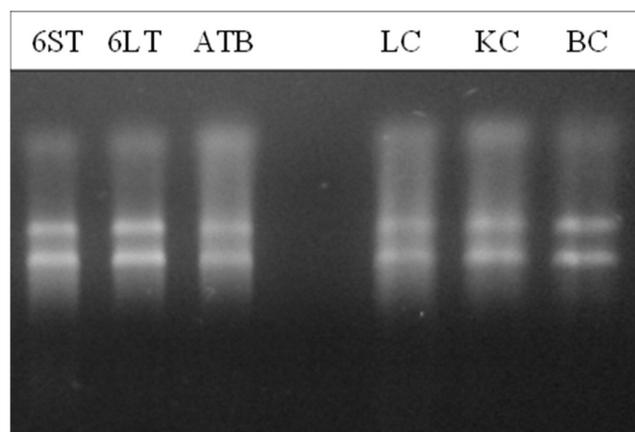


Figura 19: Extracción de ARN de tejidos de tilapia. La verificación en gel de agarosa del ARN total de tejidos infectados (6ST: bazo de individuo colectado en Piura; 6LT: hígado de individuo colectado en Piura; ATB: alevines colectados en Tarapoto) y tejidos controles no infectados (LC: bazo; KC: riñón, BC: cerebro).

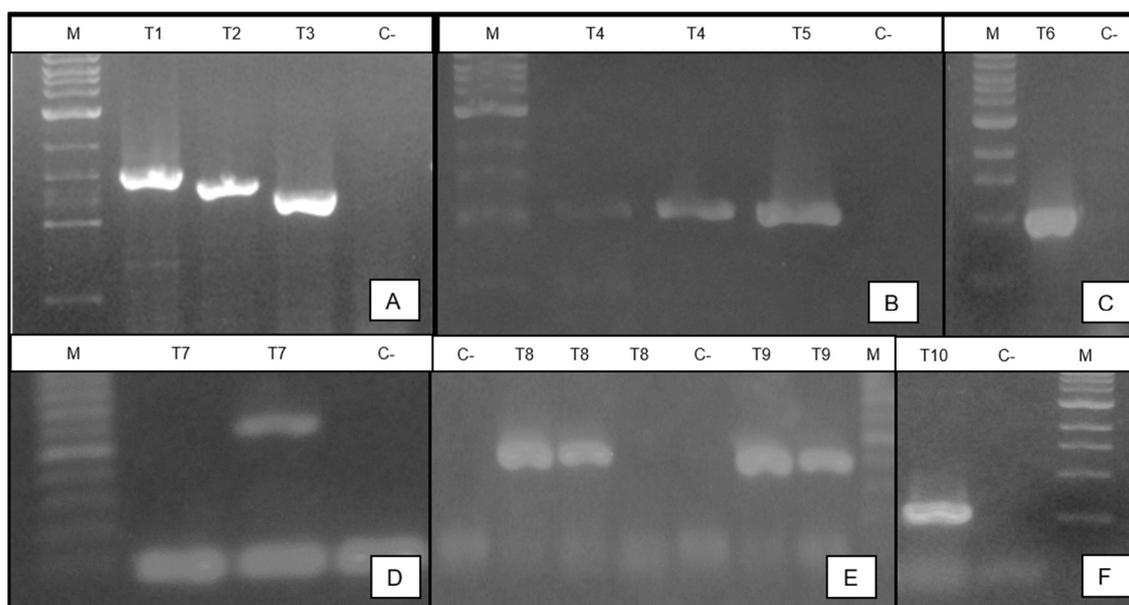


Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa mostrando los fragmentos obtenidos por PCR para la clonación correspondiente de cada segmento viral. T1 a T10: Fragmentos correspondientes a los segmentos virales 1 al 10 respectivamente. T4, T7, T8 y T9 muestran réplicas biológicas. C-: Control negativo. M: Marcador de peso molecular 1kb (Panel A, B, C y F) o 100 pb (Panel D y E).

3.22. Clonación *in vivo*

La estrategia de clonación empleando los insertos para cada segmento viral y el plásmido previamente linealizado en relación 1:1 a 1:6 (200 ng de ADN total) junto a las células de levadura, resultaron en la obtención de entre 3,400 a 25 mil transformantes por μg de ADN (Figura 21, Tabla 5). De todas las transformaciones se analizaron aleatoriamente entre 10 y 40 colonias para la verificación de la presencia del inserto por PCR (Figura 22).

Los ensayos de verificación mostraron que entre el 5 al 100 por ciento de las colonias analizadas contenían el plásmido clonado con el inserto esperado.

Tabla 5: Eficiencias de transformación y clonación por segmento viral

| <i>Segmento</i> | Eficiencia de Transformación (UFC/μg ADN) | Eficiencia de clonación (por ciento)* |
|-----------------|--|--|
| 1 | 3,400 | 43 |
| 2 | 8,650 | 20 |
| 3 | 8,650 | 50 |

| <i>Segmento</i> | Eficiencia de Transformación (UFC/μg ADN) | Eficiencia de clonación (por ciento)* |
|-----------------|--|--|
| 4 | 8,700 | 5 |
| 5 | 24,920 | 82 |
| 6 | 4,720 | 80 |
| 7 | 4,720 | 100 |
| 8 | 4,720 | 83 |
| 9 | 8,700 | 5 |
| 10 | 4,720 | 100 |

(*) porcentaje obtenido a partir de la verificación de la presencia del inserto de tamaño esperado por PCR en colonias de transformantes seleccionadas al azar.

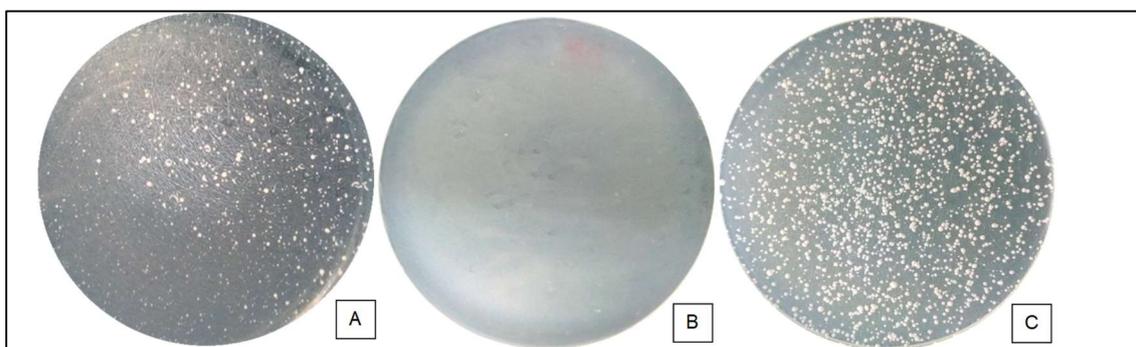


Figura 21: Resultados del proceso de clonación *in vivo* del Segmento 1. A: Co-transformación con el plásmido linealizado y el inserto 1, con una eficiencia de clonación de 1.4×10^3 UFC/μg ADN. B: Control negativo (sólo plásmido linealizado). C: Control de transformación (plásmido intacto).

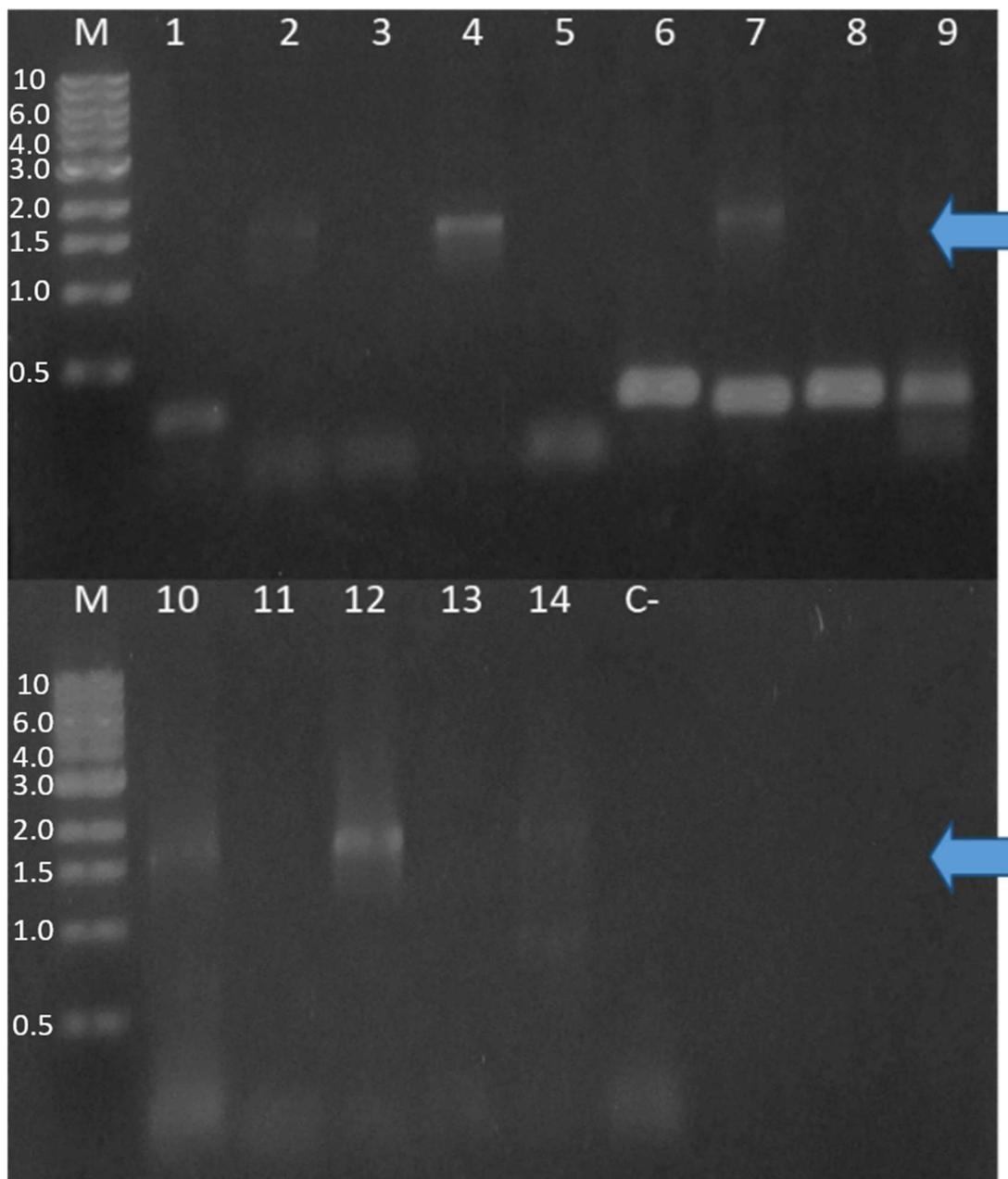


Figura 22: Verificación de la presencia del inserto del ORF1 mediante PCR a partir de ADN genómico total de 14 transformantes de levadura. Flechas azules indican el tamaño del producto esperado. M: marcador de peso molecular 1kb (New England Biolabs). Gel de agarosa 1 por ciento teñido con bromuro de etidio.

4.3. Recuperación de plásmidos en *E. coli*

El ADN total de algunos transformantes de levadura verificados por contener el plásmido recombinante esperado fue empleado para la recuperación del mismo, en *E. coli*. Para cada transformación, de 6 a 10 transformantes de *E. coli* fueron seleccionados para la

verificación del plásmido por análisis de restricción y/o PCR (Figura 23). Se seleccionaron de dos a tres plásmidos por segmento viral para el secuenciamiento respectivo.

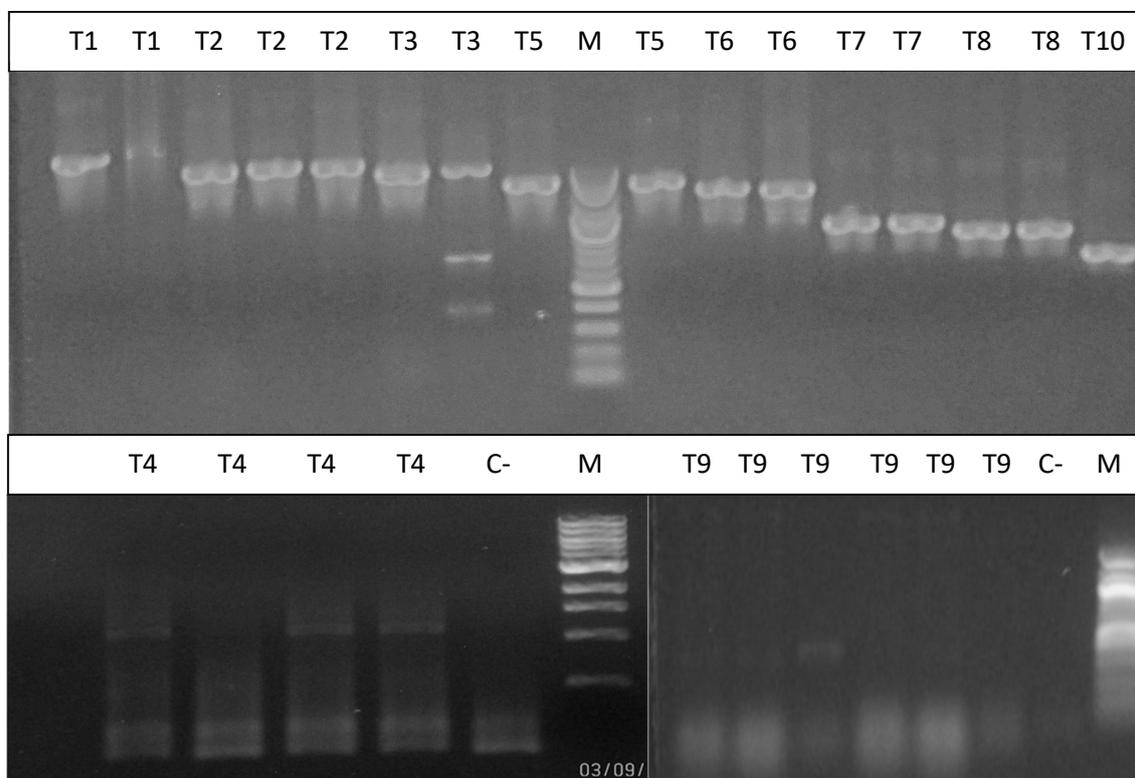


Figura 23: Verificación de la clonación de los fragmentos T1 a T10 en el plásmido pEGH mediante PCR. Confirmación del proceso de clonación por PCR. Plásmidos recuperados en transformantes de *E. coli* correspondientes a los segmentos 1 al 10 (T1 a T10 respectivamente) verificados por contener el inserto de tamaño esperado. M: Marcador de tamaño 1kb (NEB). Gel de agarosa 1 por ciento teñido con bromuro de etidio.

4.4. Secuenciamiento y análisis bioinformático

De cada segmento viral, dos plásmidos verificados previamente por contener el inserto fueron sometidos a secuenciamiento de nucleótidos con los iniciadores pEGH9145Fw y 3bRVpEGH (Figura 24, Anexo 2). El análisis comparativo de las secuencias con la base de datos GenBank (NCBI) mostró correlación entre los segmentos virales del TiLV y los plásmidos secuenciados.

Adicionalmente, se confirmó el correcto ORF de cada segmento viral así como la presencia del codón de inicio en todos los insertos.

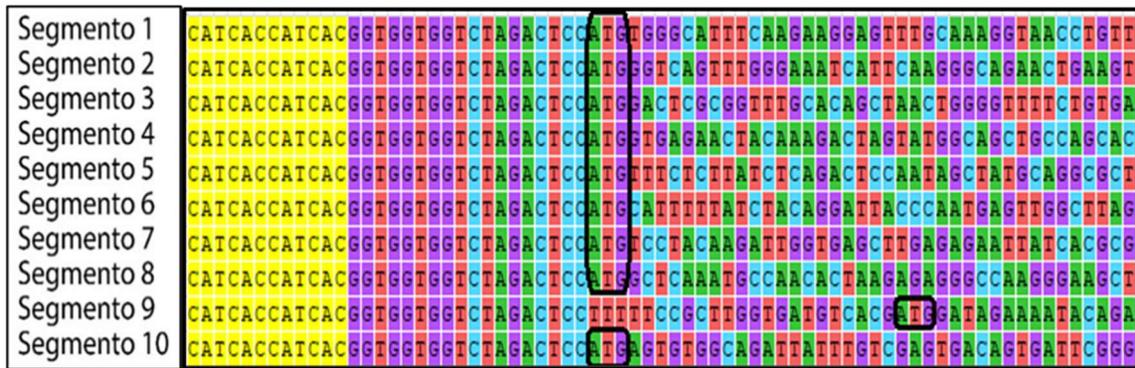


Figura 24: Alineamiento de las secuencias obtenidas de los plásmidos mostrando parte de la región codificante de polihistidinas (resaltado en amarillo) y los codones de inicio de los segmentos respectivos (marco negro). Nótese que el codón de inicio del segmento 9 se encuentra desplazado, debido a la búsqueda de condiciones óptimas para el diseño de sus iniciadores.

4.5. Análisis filogenético

El análisis filogenético mostró la formación de un clado definido entre las secuencias de Perú, Ecuador e Israel (Figura 25) con consistencias y diferenciado de las secuencias reportadas de Tailandia, Estados Unidos y Bangladesh.

Además, el análisis comparativo con la secuencia peruana reportada por (Pulido et al. 2019), se muestra un total de 33 diferencias nucleotídicas y 17 aminoácidas entre los ORFs de las secuencias virales. Los segmentos 5, 7 y 10 no mostraron diferencias al nivel de proteína, a pesar que los dos primeros mantienen solo un nucleótido de diferencia con sus homólogos respectivamente.

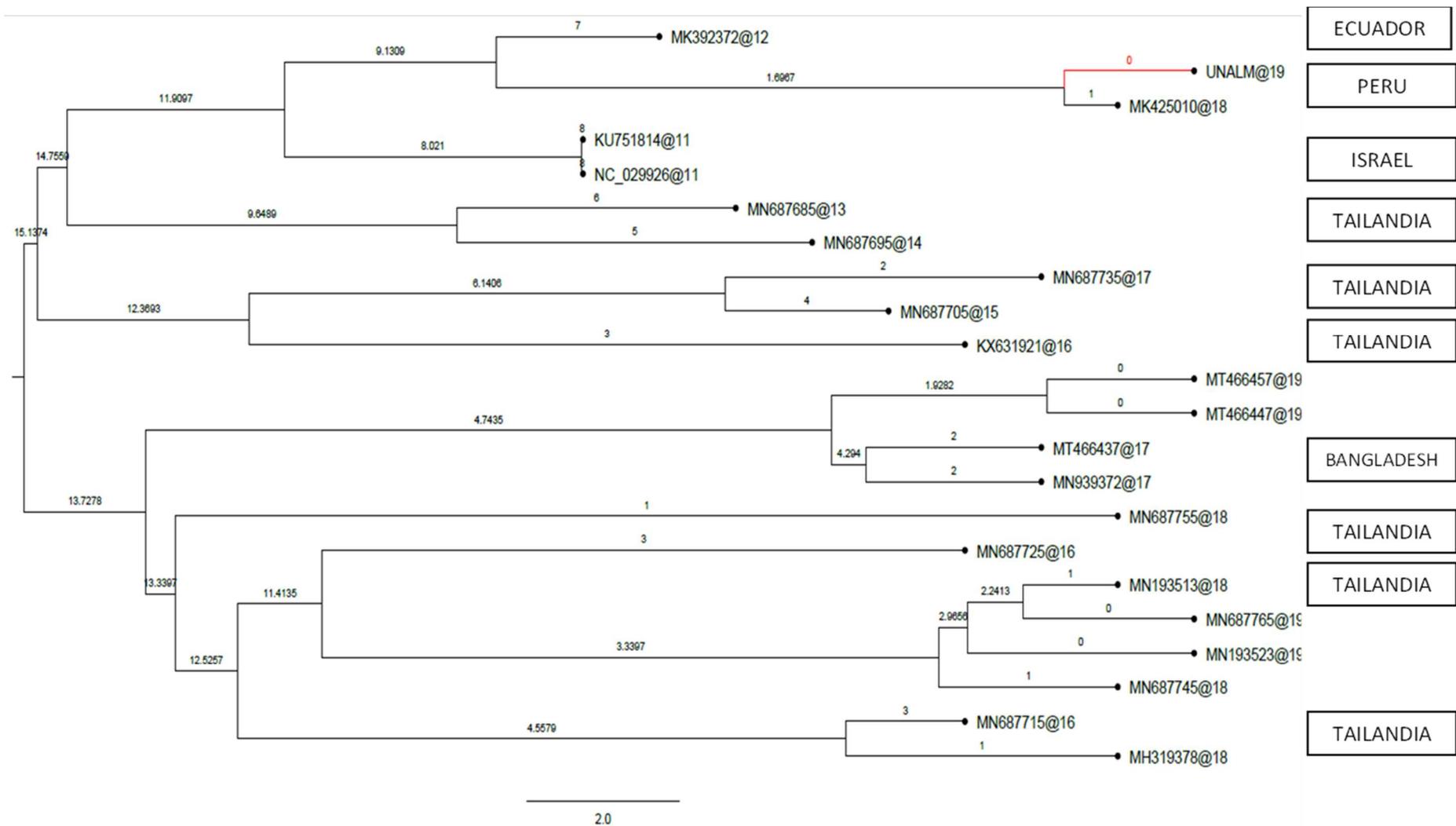


Figura 257: Filogenia de TiLV. Comparación filogenética de genomas completos de TiLV reportados en seis países distintos. *Análisis por MEGA. Método NJ. Bootstrap (x1000)*

V. DISCUSIÓN

El virus TiLV ha sido reportado en Perú desde fines del 2017 como agente causal de brotes de mortalidad de tilapia en regiones de Piura, San Martín y otras, tanto a nivel de cultivo como en cuerpos de agua de escorrentía natural, como ríos y quebradas, donde la tilapia se encuentra presente (ORGANISMO DE SANIDAD PESQUERA 2018, Castañeda Vargas et al. 2020). Los primeros reportes de mortalidad atípica fueron a partir de ríos y quebradas en la costa norte peruana, principalmente en aquellos que conectan con el país fronterizo de Ecuador hasta la represa de Poechos (Piura), donde se confirmó la presencia TiLV desde el 2014 bajo el nombre de “Síndrome de la hepatitis sincitial” (Ferguson et al. 2014).

Siendo la actividad acuícola de tilapia en Perú de carácter extensivo a semi intensivo (Baltazar Guerrero y Leon 2014), con escasa industrialización y limitadas medidas sanitarias preventivas, el virus TiLV afectó rápidamente los principales centros de cultivo en Piura y San Martín durante el primer trimestre del 2018 (ORGANISMO DE SANIDAD PESQUERA 2018). El diagnóstico se realizó mediante histopatología y RT-PCR (Eyngor et al. 2014), sin embargo, no existe tratamiento a la fecha que sea completamente efectivo y, a fin de establecer medidas de prevención y control, el desarrollo de vacunas es una estrategia muy importante a considerar, por lo que la expresión heteróloga de los segmentos virales de TiLV en levadura justifican el avance en el estudio de posibles antígenos de interés.

Actualmente, nuevos enfoques en el desarrollo de vacunas consideran el uso de microorganismos para la expresión y transporte de antígenos (Lei et al. 2015, 2015, Luu et al. 2017, Lei et al. 2016), sin embargo, el uso de la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae* muestra ventajas sobre otros sistemas debido a su condición de reconocimiento como microorganismo seguro (RAS) por no generar patogenicidad y por su capacidad de colonización del sistema digestivo del hospedero, lo cual facilita la presentación de los antígenos en la mucosa intestinal.

Si bien, los sistemas procariotas son los más comunes en la expresión heteróloga de proteínas, debido a su rápido y fácil crecimiento celular además del bajo costo que

presentan, su incapacidad para procesar proteínas complejas y el limitado sistema de secreción que presentan, restringen su uso para la síntesis de péptidos o proteínas de sencillas (Müller et al. 2006, Khoo y Suntrarachun 2012). (Müller et al. 2006) compararon la producción de proteínas heterólogas en *E. coli*, *Picchia pastoris* y un sistema celular de ovario de hámster (CHO), donde confirmaron que el sistema de expresión en levadura genera mayores rendimientos (80-150 g/L) frente al sistema procariota (20-35 g/L) y al CHO (0.5-5 g/L), tanto en proteínas citoplasmáticas como secretadas. Si bien, no se realizaron los ensayos de expresión de las proteínas virales durante el desarrollo de la tesis por motivos de medidas de restricción por el COVID-19, creemos que los rendimientos de las proteínas recombinantes podían ser mayores que en los sistemas bacterianos tradicionales.

Al igual que el uso de sistemas procariotas, el método de clonación basados en corte y empalme con enzimas de restricción también representa el método clásico para la expresión recombinante de proteínas (Ashwini et al. 2016). Sin embargo, este método es dependiente de la secuencia y se basa en protocolos laboriosos que finalmente pueden terminar en un producto de ADN con “cicatrices” o un nucleótido no específico adicionados durante el proceso de ligación (Watson y García-Nafría 2019, Huang et al. 2017). Frente a ello, otros métodos basados en la clonación *in vivo* aprovechan el sistema de recombinación homóloga de las células, tanto procariotas como eucariotas, para mejorar el proceso de clonación como tal (Ashwini et al. 2016, Huang et al. 2017, García-Nafría et al. 2016). Con base en nuestros resultados, el proceso de clonación *in vivo* en *Saccharomyces* no generó ninguna inserción o deleción que pueda alterar el marco de lectura de los segmentos virales de TiLV insertados en el plásmido pEGH.

Para clonar fragmentos de ADN *in vivo*, se han desarrollado varias metodologías basadas en homología que emplean diferentes mecanismos para el ensamblaje del ADN, tales como LIC (clonación independiente de la ligadura), ensamblaje de Gibson, clonación por fusión, SLIC, SLiCE, clonación de reparación de *gaps* en levadura, RecET, fago λ y USER, entre otros (Watson y García-Nafría 2019). Sin embargo, la estrategia de clonación *in vivo* en levadura, aplicada a los segmentos virales del TiLV, ha mostrado ser una herramienta eficiente y más accesible en comparación a herramientas tradicionales basadas en el corte y empalme de fragmentos, lo cual permite un ahorro de tiempo y dinero significativos.

La técnica de clonación *in vivo* hace uso de equipamiento básico de laboratorio y puede ser aplicada junto al diagnóstico viral, pues de acuerdo al diseño de nuestros iniciadores frente al método de diagnóstico propuesto por la OIE para TiLV (OIE, 2020), basado en una RT-PCR anidada dirigida al segmento 3, se pueden considerar alternativas de diagnóstico basadas únicamente en una PCR convencional dirigido a cualquiera de los otros segmentos y a partir de cualquiera de los tejidos blancos (cerebro, bazo, hígado, riñón). Sin embargo, estudios complementarios de sensibilidad serían necesarios para este fin.

En base al protocolo optimizado de clonación *in vivo* in *S. cerevisiae* (Kitazono 2011) empleado en este estudio y después de probar diferentes porcentajes de concentración inserto:plásmido en el proceso, se encontró que ratios entre 1:1 y 6:1 fueron adecuados en la construcción eficiente de los plásmidos esperados (Tabla 5). Se observó que los mayores porcentajes de clonación fueron logrados con los fragmentos más pequeños, similar a lo reportado por Gibson *et al.* (2009) en condiciones *in vitro* y lo reportado por Jacobus y Gross (2015) en procariontas.

La clonación de genes heterólogos virales resulta un desafío pero es aún más limitado en la clonación de segmentos de virus con genoma sentido negativo (Neumann et al. 1999), como lo es el TiLV, debido a que el ARN viral no puede servir como templado para la síntesis de proteínas. Sin embargo, se ha mostrado que la eficiencia de recuperación de virus con genoma segmentado y sentido negativo resulta mejor a través de la clonación de la secuencia complementaria (sentido positivo) por evitar la sobre hibridación con las hebras complementarias durante la síntesis de proteínas (Neumann et al. 1999). En este sentido, los ensayos de clonación de los segmentos virales de TiLV en la levadura de pan fueron generados a partir de la secuencia complementaria a la viral, es decir, la secuencia positiva del genoma, por lo que la transcripción y traducción en la levadura no sería problema, sin embargo, esto no pudo ser corroborado durante el desarrollo de la tesis.

Los sistemas eucariotas han permitido producir virus de ARN no segmentados y de sentido negativo, incluido el virus de la rabia, el virus de la estomatitis vesicular, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, virus Sendai, virus de la peste bovina, virus de la parainfluenza humana tipo 3 y virus simio 5 (Neumann et al. 1999). En TiLV, no se ha reportado la síntesis heteróloga de antígenos pero sí se han caracterizado segmentos a partir de estudios bioinformáticos, tales como la caracterización del segmento 4 (Palacios H. et al. 2021, Criollo Joaquin et al. 2019) en comparación al virus de Influenza, el cual

posee el gen de la neuroaminidasa en dicho segmento. Sin embargo, si bien dichos estudios parecen mostrar ligera homología, la caracterización de los segmentos virales realizado por (Acharya et al. 2019) mostró que este segmento es más cercano al virus Dhori mientras otros estudios experimentales han mostrado que los segmentos 9 y 10 están asociados a una potencial respuesta inmunitaria (Chamtim et al. 2022, Yu et al. 2021).

A la fecha, nueve de los diez segmentos virales no muestran homología alguna con otros virus (Abu Rass et al. 2022), lo cual dificulta el reconocimiento de los epítopes involucrados al ingreso del virus a la célula. A pesar del desarrollo de diversos tipos de vacunas contra TiLV, la eficacia de las mismas no supera el 51 por ciento de inmunidad adquirida en las vacunas tradicionales ni el 77 por ciento en el caso de nanovacunas cubiertas con dominios de manosas (Gong et al. 2022, Kembou-Ringert et al. 2023, Zeng et al. 2021). Frente a ello, la técnica de clonación *in vivo* para la expresión de proteínas virales en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* aplicada al TiLV representa una alternativa aun no explorada en la búsqueda de potenciales antígenos.

Los mecanismos de infección celular propuestos para TiLV en relación a su semejanza genética inicial (Dong et al. 2017) con el virus de influenza C fue luego reemplazada con un análisis más extenso donde se observó semejanza a genes de otros ortomixovirus (virus Dhori, Influenza A, B y C, virus ISA) (Acharya et al. 2019), los cuales emplean mecanismos de infección basados en hemaglutinación y receptores de ácido siálico. Para el caso de TiLV, Chengula et al. (2019) reportaron que durante la infección celular por este virus no se observa hemaglutinación ni cambios de pH intracelular característicos de la entrada viral mediada por receptores de ácido siálico, lo cual conduce a pensar que estaría empleando otro mecanismo de infección diferente al de los ortomixovirus. Si bien hasta ahora se ha tomado al virus de influenza A como modelo de simulación de la infección propuesta para TiLV, se ha demostrado que este último no usa el mismo mecanismo de infección, y por el contrario, usa una vía de endocitosis mediada por el citoesqueleto dependiente de colesterol e independiente a la acidificación vista en el virus de influenza A (Kembou-Ringert et al. 2023).

Respecto al análisis filogenético, se reportó previamente (Pulido *et al.* 2019) que la secuencia peruana se relacionaba estrechamente con el clado de Israel, lo cual concuerda con nuestros resultados. Sin embargo, en nuestro análisis y considerando la comparación de 20 secuencias reportadas pertenecientes a 6 países distintos, observamos mayor

similitud con el genoma ecuatoriano, lo cual era esperable debido a que los primeros eventos de mortalidad se reportaron en dicha frontera (OIE, 2020), lo cual confirmaría el ingreso del virus a Perú por este país. Además, a pesar que a la fecha existen numerosas secuencias reportadas en el GenBank sobre TiLV, la mayoría son incompletas y pertenecen a Bangladesh y Tailandia principalmente, lo que deja un vacío en los genomas presentes en países sudamericanos.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu Rass, R; Kembou-Ringert, JE; Zamostiano, R; Eldar, A; Ehrlich, M; Bacharach, E. 2022. Mapping of Tilapia Lake Virus entry pathways with inhibitors reveals dependence on dynamin activity and cholesterol but not endosomal acidification. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10:1075364. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1075364>.
- Acharya, V; Chakraborty, HJ; Rout, AK; Balabantaray, S; Behera, BK; Das, BK. 2019. Structural Characterization of Open Reading Frame-Encoded Functional Genes from Tilapia Lake Virus (TiLV). *Molecular Biotechnology* 61(12):945-957. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00217-y>.
- Adams, MJ; Lefkowitz, EJ; King, AMQ; Harrach, B; Harrison, RL; Knowles, NJ; Kropinski, AM; Krupovic, M; Kuhn, JH; Mushegian, AR; Nibert, M; Sabanadzovic, S; Sanfaçon, H; Siddell, SG; Simmonds, P; Varsani, A; Zerbini, FM; Gorbalenya, AE; Davison, AJ. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of Virology* 162(8):2505-2538. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3358-5>.
- Aich, N; Paul, A; Choudhury, TG; Saha, H. 2021. Tilapia Lake Virus (TiLV) disease: Current status of understanding. *Aquaculture and Fisheries* :S2468550X21000599. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.04.007>.
- Al-Hussinee, L; Subramaniam, K; Surachetpong, W; Popov, V; Hartman, K; Starzel, K; Yanong, R; Watson, C; Ferguson, H; Frasca Jr, S; Waltzek, T. 2019. Tilapia Lake Virus (TiLV): a Globally Emerging Threat to Tilapia Aquaculture (en línea). *EDIS* 2019(2). DOI: <https://doi.org/10.32473/edis-fa213-2019>.
- Allnutt, FCT; Bowers, RM; Rowe, CG; Vakharia, VN; LaPatra, SE; Dhar, AK. 2007. Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast. *Vaccine* 25(26):4880-4888. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.068>.

- Aly, DSM. 2013. A Review of Fish Diseases in the Egyptian Aquaculture Sector. Working Report. .
- Antezana Llaveta, G; Arandia-Guzmán, J. 2020. SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. Gaceta Medica Boliviana 43(2):172-178. DOI: <https://doi.org/10.47993/gmb.v43i2.85>.
- Arbab, M; Srinivasan, S; Hashimoto, T; Geijsen, N; Sherwood, RI. 2015. Cloning-free CRISPR. Stem Cell Reports 5(5):908-917. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.09.022>.
- Arnold, M; Van Dijk, A; López, S. 2021. Double-stranded RNA Viruses (en línea). s.l., Wiley DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119818526>.
- Ashwini, M; Murugan, SB; Balamurugan, S; Sathishkumar, R. 2016. Advances in molecular cloning. Molecular Biology 50(1):1-6. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026893316010131>.
- Bacharach, E; Mishra, N; Briese, T; Zody, MC; Kembou Tsofack, JE; Zamostiano, R; Berkowitz, A; Ng, J; Nitido, A; Corvelo, A; Toussaint, NC; Abel Nielsen, SC; Hornig, M; Del Pozo, J; Bloom, T; Ferguson, H; Eldar, A; Lipkin, WI. 2016. Characterization of a Novel Orthomyxo-like Virus Causing Mass Die-Offs of Tilapia. mBio 7(2):e00431-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00431-16>.
- Bacharach, E; Mishra, N; Briese, T; Zody, MC; Kembou Tsofack, JE; Zamostiano, R; Berkowitz, A; Ng, J; Nitido, A; Corvelo, A; Toussaint, NC; Abel Nielsen, SC; Hornig, M; Del Pozo, J; Bloom, T; Ferguson, H; Eldar, A; Lipkin, WI. 2016. Characterization of a Novel Orthomyxo-like Virus Causing Mass Die-Offs of Tilapia. mBio 7(2):e00431-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00431-16>.
- Bal, J; Luong, NN; Park, J; Song, K-D; Jang, Y-S; Kim, D-H. 2018. Comparative immunogenicity of preparations of yeast-derived dengue oral vaccine candidate (en línea). Microbial Cell Factories 17(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0876-0>.
- Balamurugan, V; Venkatesan, G; Sen, A; Annamalai, L; Bhanuprakash, V; Singh, RK. 2010. Recombinant protein-based viral disease diagnostics in veterinary

- medicine. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 10(6):731-753. DOI: <https://doi.org/10.1586/erm.10.61>.
- Baltazar Guerrero, P; Leon, J. 2014. La acuicultura en el Perú: Producción, comercialización, exportación y potencialidades. s.l., s.e. DOI: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25733.24802>.
- Behera, BK; Pradhan, PK; Swaminathan, TR; Sood, N; Paria, P; Das, A; Verma, DK; Kumar, R; Yadav, MK; Dev, AK; Parida, PK; Das, BK; Lal, KK; Jena, JK. 2018. Emergence of Tilapia Lake Virus associated with mortalities of farmed Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) in India. *Aquaculture* 484:168-174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.025>.
- Bertero, A; Brown, S; Vallier, L. 2017. *Methods of Cloning* (en línea). s.l., Elsevier. p. 19-39 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00002-3>.
- Biller-Takahashi, JD; Urbinati, EC. 2014. *Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. Anais da Academia Brasileira de Ciências* 86(3):1484-1506. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201420130159>.
- Booth, WT; Schlachter, CR; Pote, S; Ussin, N; Mank, NJ; Klapper, V; Offermann, LR; Tang, C; Hurlburt, BK; Chruszcz, M. 2018. Impact of an N-terminal Polyhistidine Tag on Protein Thermal Stability. *ACS Omega* 3(1):760-768. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01598>.
- Brudeseth, BE; Wiulsrød, R; Fredriksen, BN; Lindmo, K; Løkling, K-E; Bordevik, M; Steine, N; Klevan, A; Gravningen, K. 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & Shellfish Immunology* 35(6):1759-1768. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.029>.
- Castañeda Vargas, AE; Manuel Feria, M; Odalis Toledo, O; Castillo, D; Cueva, M; Motte, E. 2020. Detección del virus de la tilapia del lago (TiLV) mediante semi-nested RT-PCR en tilapias cultivadas provenientes de dos regiones del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 31(2):e16158. DOI: <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.16158>.

- Celie, PH; Parret, AH; Perrakis, A. 2016. Recombinant cloning strategies for protein expression. *Current Opinion in Structural Biology* 38:145-154. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.06.010>.
- Chaitanya, KV. 2019. *Structure and Organization of Virus Genomes* (en línea). Singapore, Springer Singapore. p. 1-30 DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-15-0702-1_1.
- Chamtim, P; Suwan, E; Dong, HT; Sirisuay, S; Areechon, N; Wangkahart, E; Hirono, I; Mavichak, R; Unajak, S. 2022. Combining segments 9 and 10 in DNA and recombinant protein vaccines conferred superior protection against tilapia lake virus in hybrid red tilapia (*Oreochromis* sp.) compared to single segment vaccines. *Frontiers in Immunology* 13:935480. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.935480>.
- Chan, K-M; Liu, Y-T; Ma, C-H; Jayaram, M; Sau, S. 2013. The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: A miniaturized selfish genome with optimized functional competence. *Plasmid* 70(1):2-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.03.001>.
- Chen, R. 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances* 30(5):1102-1107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013>.
- Chengula, AA; Mutoloki, S; Evensen, Ø; Munang'andu, HM. 2019. Tilapia Lake Virus Does Not Hemagglutinate Avian and Piscine Erythrocytes and NH₄Cl Does Not Inhibit Viral Replication In Vitro. *Viruses* 11(12):1152. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11121152>.
- Cho, SY; Kim, HJ; Lan, NT; Han, H-J; Lee, D-C; Hwang, JY; Kwon, M-G; Kang, BK; Han, SY; Moon, H; Kang, HA; Kim, H-J. 2017. Oral vaccination through voluntary consumption of the convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* with yeast producing the capsid protein of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Veterinary Microbiology* 204:159-164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.022>.

- Choi, YR; Kim, HJ; Lee, JY; Kang, HA; Kim, H-J. 2013. Chromatographically-purified capsid proteins of red-spotted grouper nervous necrosis virus expressed in *Saccharomyces cerevisiae* form virus-like particles. *Protein Expression and Purification* 89(2):162-168. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.03.007>.
- Clinical and Laboratory Manual of Fish Diseases. 2016. 1. Auflage. Saarbrücken, LAP LAMBERT Academic Publishing.
- Cohen, SN; Chang, ACY; Boyer, HW; Helling, RB. 1973. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70(11):3240-3244. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240>.
- Cottet, L; Rivas-Aravena, A; Cortez-San Martin, M; Sandino, AM; Spencer, E. 2011. Infectious salmon anemia virus—Genetics and pathogenesis. *Virus Research* 155(1):10-19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.021>.
- Criollo Joaquin, MP; Motte, E; Salvatierra, M; Medina, J; Diringer, B; Sandoval, G; Mialhe, E. 2019. Diseño y evaluación de la expresión de una potencial vacuna de ADN contra el virus de la Tilapia de Lago (TiLV). *Revista Peruana de Biología* 26(3):301-310. DOI: <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i3.15516>.
- Dong, HT; Ataguba, GA; Khunrae, P; Rattanaojpong, T; Senapin, S. 2017. Evidence of TiLV infection in tilapia hatcheries from 2012 to 2017 reveals probable global spread of the disease. *Aquaculture* 479:579-583. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.035>.
- Durborow, RM; Wise, DJ; Terhune, JS. 2003. Saprolegniasis (Winter Fungus) and Branchiomycosis of Commercially Cultured Channel Catfish. .
- Eckert-Boulet, N; Rothstein, R; Lisby, M. 2011. Cell Biology of Homologous Recombination in Yeast (en línea). In *Tsubouchi, H (ed.)*. Totowa, NJ, Humana Press, vol.745, (Methods in Molecular Biology). p. 523-536 DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-129-1_30.
- ERHARTt, E; Hollenberg, CP. s. f. The Presence of a Defective LEU2 Gene on 2pi DNA Recombinant Plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* Is Responsible for Curing and High Copy Number. *J. BACTERIOL.* .

- Eyngor, M; Zamostiano, R; Kembou Tsofack, JE; Berkowitz, A; Bercovier, H; Tinman, S; Lev, M; Hurvitz, A; Galeotti, M; Bacharach, E; Eldar, A. 2014. Identification of a Novel RNA Virus Lethal to Tilapia. *Journal of Clinical Microbiology* 52(12):4137-4146. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00827-14>.
- _____. 2014. Identification of a Novel RNA Virus Lethal to Tilapia. *Journal of Clinical Microbiology* 52(12):4137-4146. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00827-14>.
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020 (en línea). s.l., FAO. DOI: <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- _____. 2020. FAO Fisheries & Aquaculture - Visión general del sector acuícola nacional - Perú.pdf (en línea). s.l., s.e. Disponible en http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_peru/es.
- Fauquet, CM. 1999. TAXONOMY, CLASSIFICATION AND NOMENCLATURE OF VIRUSES (en línea). s.l., Elsevier. p. 1730-1756 DOI: <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0277>.
- Ferguson, HW; Kabuusu, R; Beltran, S; Reyes, E; Lince, JA; del Pozo, J. 2014. Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): a case report. *Journal of Fish Diseases* 37(6):583-589. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfd.12142>.
- Ferrer-Miralles, N; Saccardo, P; Corchero, JL; Xu, Z; García-Fruitós, E. 2015. General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins (en línea). In *García-Fruitós, E (ed.)*. New York, NY, Springer New York, vol.1258. p. 1-24 DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_1.
- Galardini, M; Busby, BP; Vieitez, C; Dunham, AS; Typas, A; Beltrao, P. 2019. The impact of the genetic background on gene deletion phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae* (en línea). *Molecular Systems Biology* 15(12). DOI: <https://doi.org/10.15252/msb.20198831>.

- García-Nafría, J; Watson, JF; Greger, IH. 2016. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Scientific Reports* 6(1):27459. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep27459>.
- Gibson, DG; Young, L; Chuang, R-Y; Venter, JC; Hutchison, CA; Smith, HO. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 6(5):343-345. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- Gong, Y-M; Wei, X-F; Zhou, G-Q; Liu, M-Z; Li, P-F; Zhu, B. 2022. Mannose functionalized biomimetic nanovaccine enhances immune responses against tilapia lake virus. *Aquaculture* 560:738535. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738535>.
- Hillestad, B; Johannessen, S; Melingen, GO; Moghadam, HK. (2021). Identification of a new Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) isolate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) that causes mortality in resistant fish (en línea). s.l., Genomics. (preprint) DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.05.23.445331>.
- Huang, F; Spangler, JR; Huang, AY. 2017. In vivo cloning of up to 16 kb plasmids in *E. coli* is as simple as PCR. *PLOS ONE* 12(8):e0183974. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183974>.
- Iizasa, E; Nagano, Y. 2006. Highly efficient yeast-based in vivo DNA cloning of multiple DNA fragments and the simultaneous construction of yeast/ *Escherichia coli* shuttle vectors. *BioTechniques* 40(1):79-83. DOI: <https://doi.org/10.2144/000112041>.
- Jacobus, AP; Gross, J. 2015. Optimal Cloning of PCR Fragments by Homologous Recombination in *Escherichia coli*. *PLOS ONE* 10(3):e0119221. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119221>.
- Jansen, MD; Mohan, CV. 2017. Tilapia lake virus (TiLV): Literature review. 2017 :12.
- Johnston', M; Davis, RW. 1984. Sequences That Regulate the Divergent GALJ-GALIO Promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *MOL. CELL. BIOL.* 4.

- Joska, TM; Mashruwala, A; Boyd, JM; Belden, WJ. 2014. A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. *Journal of Microbiological Methods* 100:46-51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.11.013>.
- Keawcharoen, J; Techangamsuwan, S; Ponpornpisit, A; Lombardini, ED; Patchimasiri, T; Pirarat, N. 2015. Genetic characterization of a betanodavirus isolated from a clinical disease outbreak in farm-raised tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in Thailand. *Journal of Fish Diseases* 38(1):49-54. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfd.12200>.
- Kembou-Ringert, JE; Steinhagen, D; Readman, J; Daly, JM; Adamek, M. 2023. Tilapia Lake Virus Vaccine Development: A Review on the Recent Advances. *Vaccines* 11(2):251. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11020251>.
- _____. 2023. Tilapia Lake Virus Vaccine Development: A Review on the Recent Advances. *Vaccines* 11(2):251. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11020251>.
- Khow, O; Suntrarachun, S. 2012. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(2):159-162. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60213-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60213-X).
- Kibenge, FSB; Godoy, MG. 2016. *Aquaculture virology*. Amsterdam ; New York, Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier. 549 p.
- _____. 2016. *Aquaculture virology*. Amsterdam ; New York, Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier. 549 p.
- Kim, HJ; Kim, H-J. 2017. Yeast as an expression system for producing virus-like particles: what factors do we need to consider? *Letters in Applied Microbiology* 64(2):111-123. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.12695>.
- Kitazono, AA. 2009. Improved gap-repair cloning method that uses oligonucleotides to target cognate sequences. *Yeast* 26(9):497-505. DOI: <https://doi.org/10.1002/yea.1680>.

- _____. 2011. Optimized protocols and plasmids for in vivo cloning in yeast. *Gene* 484(1-2):86-89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.006>.
- Kumar, N; Sharma, S; Barua, S; Tripathi, BN; Rouse, BT. 2018. Virological and Immunological Outcomes of Coinfections. *Clinical Microbiology Reviews* 31(4):e00111-17, [/cmr/31/4/e00111-17.atom](https://doi.org/10.1128/CMR.00111-17). DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-17>.
- Lam Cabanillas, ER; León Risco, AO; León Risco, KB; Llamó Hoyos, GL; López Zavaleta, RM; Luzuriaga Tirado, EDR; Mendoza Blas, AM; Huamán Saavedra, JJ. 2021. Molecular basis of COVID-19 pathogenesis and in silico studies of potential pharmacological treatment. *Revista de la Facultad de Medicina Humana* 21(2):417-432. DOI: <https://doi.org/10.25176/RFMH.v21i1.3327>.
- van Leeuwen, J; Andrews, B; Boone, C; Tan, G. 2015. Rapid and Efficient Plasmid Construction by Homologous Recombination in Yeast. *Cold Spring Harbor Protocols* 2015(9):pdb.prot085100. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot085100>.
- Lei, H; Jin, S; Karlsson, E; Schultz-Cherry, S; Ye, K. 2016. Yeast Surface-Displayed H5N1 Avian Influenza Vaccines. *Journal of Immunology Research* 2016:1-12. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/4131324>.
- Lei, H; Peng, X; Ouyang, J; Zhao, D; Jiao, H; Shu, H; Ge, X. 2015. Protective immunity against influenza H5N1 virus challenge in chickens by oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing neuraminidase (en línea). *BMC Veterinary Research* 11(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0399-4>.
- Lei, H; Peng, X; Zhao, D; Ouyang, J; Jiao, H; Shu, H; Ge, X. 2015. *Lactococcus lactis* displayed neuraminidase confers cross protective immunity against influenza A viruses in mice. *Virology* 476:189-195. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.017>.
- Liamnimitr, P; Thammatorn, W; U-thoomporn, S; Tattiyapong, P; Surachetpong, W. 2018. Non-lethal sampling for Tilapia Lake Virus detection by RT-qPCR and

cell culture. *Aquaculture* 486:75-80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.015>.

Liu, M; Feng, X; Ding, Y; Zhao, G; Liu, H; Xian, M. 2015. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to improve recombinant protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(24):10367-10377. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6955-9>.

Luu, V-T; Moon, HY; Hwang, JY; Kang, B-K; Kang, HA. 2017. Development of recombinant *Yarrowia lipolytica* producing virus-like particles of a fish nervous necrosis virus. *Journal of Microbiology* 55(8):655-664. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7218-5>.

MacKinnon, B; Debnath, PP; Bondad-Reantaso, MG; Fridman, S; Bin, H; Nekouei, O. 2023. Improving tilapia biosecurity through a value chain approach. *Reviews in Aquaculture* 15(S1):57-91. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12776>.

Madeo, F; Engelhardt, S; Herker, E; Lehmann, N; Maldener, C; Proksch, A; Wissing, S; Fröhlich, K-U. 2002. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Current Genetics* 41(4):208-216. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00294-002-0310-2>.

Marintcheva, B. 2018. Introduction to Viral Structure, Diversity and Biology * *Parts of this chapter were originally published in Marintcheva B. A box of paradoxes: the fascinating world of viruses. *Bridgew Rev* 2013;32(2):25–8. http://vc.bridgew.edu/br_rev/vol32/iss2/8 and are reproduced here with the permission of the editor. (en línea). s.l., Elsevier. p. 1-26 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810514-6.00001-5>.

Martens, C; Krett, B; Laybourn, PJ. 2001. RNA polymerase II and TBP occupy the repressed *CYC1* promoter. *Molecular Microbiology* 40(4):1009-1019. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02445.x>.

Mugimba, KK; Lamkhannat, M; Dubey, S; Mutoloki, S; Munang'andu, HM; Evensen, Ø. 2020. Tilapia lake virus downplays innate immune responses during early stage of infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Scientific Reports* 10(1):20364. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73781-y>.

- Mugimba, KK; Tal, S; Dubey, S; Mutoloki, S; Dishon, A; Evensen, Ø; Munang'andu, HM. 2019. Gray (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) and Red (*Oreochromis* spp.) Tilapia Show Equal Susceptibility and Proinflammatory Cytokine Responses to Experimental Tilapia Lake Virus Infection. *Viruses* 11(10):893. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11100893>.
- Mulei, IR; Nyaga, PN; Mbuthia, PG; Waruiru, RM; Njagi, LW; Mwihi, EW; Gamil, AAA; Evensen, Ø; Mutoloki, S. 2018. Infectious pancreatic necrosis virus isolated from farmed rainbow trout and tilapia in Kenya is identical to European isolates. *Journal of Fish Diseases* 41(8):1191-1200. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfd.12807>.
- Mülleder, M; Campbell, K; Matsarskaia, O; Eckerstorfer, F; Ralser, M. 2016. *Saccharomyces cerevisiae* single-copy plasmids for auxotrophy compensation, multiple marker selection, and for designing metabolically cooperating communities. *F1000Research* 5:2351. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.9606.1>.
- Müller, D; Bayer, K; Mattanovich, D. 2006. Potential and limitations of prokaryotic and eukaryotic expression systems for recombinant protein production - a comparative view. *Microbial Cell Factories* 5(Suppl 1):P61. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-S1-P61>.
- Neumann, G; Watanabe, T; Ito, H; Watanabe, S; Goto, H; Gao, P; Hughes, M; Perez, DR; Donis, R; Hoffmann, E; Hobom, G; Kawaoka, Y. 1999. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(16):9345-9350. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9345>.
- Newburn, LR; White, KA. 2019. Trans-Acting RNA–RNA Interactions in Segmented RNA Viruses. *Viruses* 11(8):751. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11080751>.
- Ogino, T; Green, TJ. 2019. RNA Synthesis and Capping by Non-segmented Negative Strand RNA Viral Polymerases: Lessons From a Prototypic Virus. *Frontiers in Microbiology* 10:1490. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01490>.

- Oldenburg, K. 1997. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Research* 25(2):451-452. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/25.2.451>.
- ORGANISMO DE SANIDAD PESQUERA. 2018. COMUNICADO-N-018-2018 (en línea). s.l., s.e. Disponible en https://www.sanipes.gob.pe/documentos/_COMUNICADO-N-018-2018-SANIPES.pdf.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. 2023. Manual Acuático de la OMSA (en línea). s.l., s.e. Disponible en <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-acuatico/>.
- Ortega Asencios, Y; Barreiro Sánchez, F; Bueno Mendizábal, H; Huancaré Pusari, K; Ostos Alfonso, H; Manchego Sayán, A; Pereira Figueiredo, MA; Gómez Manrique, W; de Andrade Belo, MA; Sandoval Chaupe, N. 2016. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. *Aquaculture Reports* 4:74-79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.06.002>.
- Palacios H., S; Manchego S., A; Castro S., G; Herrera R., A; Valera A., A; Sandoval C., N. 2021. Caracterización molecular del segmento 4 del virus de la tilapia de lago aislado de tilapias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas en Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 32(2):e20016. DOI: <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i2.20016>.
- Pastrian-Soto, G. 2020. Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *International journal of odontostomatology* 14(3):331-337. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>.
- Pérez-Sánchez, T; Mora-Sánchez, B; Balcázar, JL. 2018. Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges (en línea). *Trends in Microbiology* . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>.

- Pierce, BD; Wendland, B. 2009. Sequence of the yeast protein expression plasmid pEG(KT). *Yeast* 26(6):349-353. DOI: <https://doi.org/10.1002/yea.1667>.
- Pierezan, F; Yun, S; Surachetpong, W; Soto, E. 2019. Intra-gastric and intracoelomic injection challenge models of tilapia lake virus infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. *Journal of Fish Diseases* 42(9):1301-1307. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfd.13052>.
- Pulido, LLH; Mora, CM; Hung, AL; Dong, HT; Senapin, S. 2019. Tilapia lake virus (TiLV) from Peru is genetically close to the Israeli isolates. *Aquaculture* 510:61-65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.058>.
- Reece-Hoyes, JS; Walhout, AJM. 2018. Gateway Recombinational Cloning. *Cold Spring Harbor Protocols* 2018(1):pdb.top094912. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.top094912>.
- Rosano, GL; Ceccarelli, EA. 2014. Recombinant protein expression in microbial systems (en línea). *Frontiers in Microbiology* 5. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00341>.
- Shehata, AA; Fiebig, P; H.Sultan; Hafez, M; Liebert, UG. 2012. Development of a recombinant ELISA using yeast (*Pichia pastoris*)-expressed polypeptides for detection of antibodies against avian influenza A subtype H5. *Journal of Virological Methods* 180(1-2):18-25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.12.004>.
- Shlapobersky, M; Sinyakov, MS; Katzenellenbogen, M; Sarid, R; Don, J; Avtalion, RR. 2010. Viral encephalitis of tilapia larvae: Primary characterization of a novel herpes-like virus. *Virology* 399(2):239-247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.001>.
- Shola, DTN; Yang, C; Kewaldar, V-S; Kar, P; Bustos, V. 2020. New Additions to the CRISPR Toolbox: CRISPR- *CLONInG* and CRISPR- *CLIP* for Donor Construction in Genome Editing. *The CRISPR Journal* 3(2):109-122. DOI: <https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0062>.

- Soliman, M; Aboeisa, M; Mohamed, S; Saleh, W. 2008. FIRST RECORD OF ISOLATION AND IDENTIFICATION OF SPRING VIRAEMIA OF CARP VIRUS FROM OREOCHROMIS NILOTICUS IN EGYPT (en línea). s.l., s.e. Disponible en <https://ag.arizona.edu/azaqua/ista/ISTA8/MagdyKhalil.doc>.
- Subramaniam, K; Gotesman, M; Smith, CE; Steckler, NK; Kelley, KL; Groff, JM; Waltzek, TB. 2016. Megalocytivirus infection in cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 119(3):253-258. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao02985>.
- Surachetpong, W; Janetanakit, T; Nonthabenjawan, N; Tattiyapong, P; Sirikanchana, K; Amonsin, A. 2017. Outbreaks of Tilapia Lake Virus Infection, Thailand, 2015–2016. *Emerging Infectious Diseases* 23(6):1031-1033. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2306.161278>.
- Tamura, K; Stecher, G; Peterson, D; Filipinski, A; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12):2725-2729. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Tattiyapong, P; Sirikanchana, K; Surachetpong, W. 2018. Development and validation of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction for tilapia lake virus detection in clinical samples and experimentally challenged fish. *Journal of Fish Diseases* 41(2):255-261. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfd.12708>.
- Thawornwattana, Y; Dong, HT; Phiwsaiya, K; Sangsuriya, P; Senapin, S; Aiewsakun, P. 2020. Tilapia lake virus (TiLV): Genomic epidemiology and its early origin. *Transboundary and Emerging Diseases* :tbed.13693. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13693>.
- Toranzo, AE; Romalde, JL; Magariños, B; Barja, JL. 2009. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. (86):22.
- Upadhyay, C; Ammayappan, A; Vakharia, VN. 2009. Detection of NP, N3 and N7 antibodies to avian influenza virus by indirect ELISA using yeast-expressed antigens. *Virology Journal* 6(1):158. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-158>.

- Watson, JF; García-Nafria, J. 2019. In vivo DNA assembly using common laboratory bacteria: A re-emerging tool to simplify molecular cloning. *Journal of Biological Chemistry* 294(42):15271-15281. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.009109>.
- Yu, N; Zeng, W; Wang, J; Zhang, Y; Zhang, X; Liu, Z. (2021). A High Efficacy DNA Vaccine Against Tilapia Lake Virus in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) (en línea). s.l., LIFE SCIENCES. (preprint) DOI: <https://doi.org/10.20944/preprints202107.0626.v1>.
- Zeng, W; Wang, Y; Chen, X; Wang, Q; Bergmann, SM; Yang, Y; Wang, Y; Li, B; Lv, Y; Li, H; Lan, W. 2021. Potency and efficacy of VP20-based vaccine against tilapia lake virus using different prime-boost vaccination regimens in tilapia. *Aquaculture* 539:736654. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736654>.
- Zhang, JJ; Yamanaka, K; Tang, X; Moore, BS. 2019. Direct cloning and heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters by transformation-associated recombination (en línea). s.l., Elsevier, vol.621. p. 87-110 DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.02.026>.
- Zhao, RY. 2017. Yeast for virus research. *Microbial Cell* 4(10):311-330. DOI: <https://doi.org/10.15698/mic2017.10.592>.
- Zhao, Y; Lieberman, HB. 1995. *Schizosaccharomyces pombe*: A Model for Molecular Studies of Eukaryotic Genes. *DNA and Cell Biology* 14(5):359-371. DOI: <https://doi.org/10.1089/dna.1995.14.359>.

VII. ANEXOS

Anexo 1: Secuencias genómicas de TiLV reportadas en la base de datos GenBank (NCBI. Octubre, 2022)

| PAIS | ACCESIO N | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Israel | KU751814. 1 | KU751814. 1 | KU751815.1 | KU751816.1 | KU751817.1 | KU751818.1 | KU751819.1 | KU751820.1 | KU751821.1 | KU751822. 1 | KU751823. 1 |
| Thailandia | KX631921. 1 | KX631921. 1 | KX631922.1 | KX631923.1 | KX631924.1 | KX631925.1 | KX631926.1 | KX631927.1 | KX631928.1 | KX631929. 1 | KX631930. 1 |
| Thailandia | MH319378. 1 | MH319378. 1 | MH319379. 1 | MH319380. 1 | MH319381. 1 | MH319382. 1 | MH319383. 1 | MH319384. 1 | MH319385. 1 | MH319386. 1 | MH319387. 1 |
| Ecuador | MK392372. 1 | MK392372. 2 | MK392373. 1 | MK392374. 1 | MK392375. 1 | MK392376. 1 | MK392377. 1 | MK392378. 1 | MK392379. 1 | MK392380. 1 | MK392381. 1 |
| Peru | MK425010. 1 | MK425010. 1 | MK425011. 1 | MK425012. 1 | MK425013. 1 | MK425014. 1 | MK425015. 1 | MK425016. 1 | MK425017. 1 | MK425018. 1 | MK425019. 1 |
| USA | MN193513. 1 | MN193513. 1 | MN193514. 1 | MN193515. 1 | MN193516. 1 | MN193517. 1 | MN193518. 1 | MN193519. 1 | MN193520. 1 | MN193521. 1 | MN193522. 1 |
| USA | MN193523. 1 | MN193523. 1 | MN193524. 1 | MN193525. 1 | MN193526. 1 | MN193527. 1 | MN193528. 1 | MN193529. 1 | MN193530. 1 | MN193531. 1 | MN193532. 1 |
| Thailandia | MN687685. 1 | MN687685. 1 | MN687686. 1 | MN687687. 1 | MN687688. 1 | MN687689. 1 | MN687690. 1 | MN687691. 1 | MN687692. 1 | MN687693. 1 | MN687694. 1 |
| Thailandia | MN687695. 1 | MN687695. 1 | MN687696. 1 | MN687697. 1 | MN687698. 1 | MN687699. 1 | MN687700. 1 | MN687701. 1 | MN687702. 1 | MN687703. 1 | MN687704. 1 |
| Thailandia | MN687705. 1 | MN687705. 1 | MN687706. 1 | MN687707. 1 | MN687708. 1 | MN687709. 1 | MN687710. 1 | MN687711. 1 | MN687712. 1 | MN687713. 1 | MN687714. 1 |
| Thailandia | MN687715. 1 | MN687715. 1 | MN687716. 1 | MN687717. 1 | MN687718. 1 | MN687719. 1 | MN687720. 1 | MN687721. 1 | MN687722. 1 | MN687723. 1 | MN687724. 1 |
| Thailandia | MN687725. 1 | MN687725. 1 | MN687726. 1 | MN687727. 1 | MN687728. 1 | MN687729. 1 | MN687730. 1 | MN687731. 1 | MN687732. 1 | MN687733. 1 | MN687734. 1 |
| Thailandia | MN687735. 1 | MN687735. 1 | MN687736. 1 | MN687737. 1 | MN687738. 1 | MN687739. 1 | MN687740. 1 | MN687741. 1 | MN687742. 1 | MN687743. 1 | MN687744. 1 |
| Thailandia | MN687745. 1 | MN687745. 1 | MN687746. 1 | MN687747. 1 | MN687748. 1 | MN687749. 1 | MN687750. 1 | MN687751. 1 | MN687752. 1 | MN687753. 1 | MN687754. 1 |
| Thailandia | MN687755. 1 | MN687755. 1 | MN687756. 1 | MN687757. 1 | MN687758. 1 | MN687759. 1 | MN687760. 1 | MN687761. 1 | MN687762. 1 | MN687763. 1 | MN687764. 1 |

| PAIS | ACCESIO N | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Thailandia | MN687765. 1 | MN687765. 1 | MN687766. 1 | MN687767. 1 | MN687768. 1 | MN687769. 1 | MN687770. 1 | MN687771. 1 | MN687772. 1 | MN687773. 1 | MN687774. 1 |
| Banglades h | MN939372. 1 | MN939372. 1 | MN939373. 1 | MN939374. 1 | MN939375. 1 | MN939376. 1 | MN939377. 1 | MN939378. 1 | MN939379. 1 | MN939380. 1 | MN939381. 1 |
| Banglades h | MT466437. 1 | MT466437. 1 | MT466438. 1 | MT466439. 1 | MT466440. 1 | MT466441. 1 | MT466442. 1 | MT466443. 1 | MT466444. 1 | MT466445. 1 | MT466446. 1 |
| Banglades h | MT466447. 1 | MT466447. 1 | MT466448. 1 | MT466449. 1 | MT466450. 1 | MT466451. 1 | MT466452. 1 | MT466453. 1 | MT466454. 1 | MT466455. 1 | MT466456. 1 |
| Banglades h | MT466457. 1 | MT466457. 1 | MT466458. 1 | MT466459. 1 | MT466460. 1 | MT466461. 1 | MT466462. 1 | MT466463. 1 | MT466464. 1 | MT466465. 1 | MT466466. 1 |
| Israel | NC_029926 | NC_029926 | NC_029921. 1 | NC_029927. 1 | NC_029922. 1 | NC_029923. 1 | NC_029928. 1 | NC_029924. 1 | NC_029929. 1 | NC_029925 | NC_029930 |

Anexo 2: Secuencias nucleotídicas de los segmentos virales clonados en el plásmido pEGH.

Segmento 1: consenso_AKE104

ATGTGGGCATTTCAAGAAGGAGTTTGCAAAGGTAACCTGTTATCAGGCCCGACCTC
AATGAAGGCACCGGATTCAGCAGCGAGAGATCATTAGACAGAGCGTCTGAAATT
ATGACAGGAAGATCGTACAATGCTGTCCACACTGGAGATTTAAGTAAGTTGCCTAA
TCAGGGAGAAAGTCCACTGAGGATAGTCGATTCCGACCTCTATTCAGAGAGGAGCT
GCTGTTGGGTTATAGAGAAGGAAGGTAGAGTTGTGTGCAAAAGTACCACACTCACC
CGCGGTATGACGAGCCTGTTGAACACAACAAAGTGTAGTTCTCCCTCTGAGCTCAT
ATGCAAGGTCTTGACAGTAGAATCCCTATCTGAAAAGATAGGTGACACGAGCGTCCG
AGGAGTTACTTTCTCATGGCAGGTACTTCAAGTGCGCACTTCGCGACCAAGAGAGG
GGTAAACCCAAGAGCAGGGCTATCTTTCTGTCACATCCATTCTTTAGATTGCTTTCT
TCTGTGGTAGAGACGCACGCTAGATCTGTGCTATCAAAGGTCTCAGCAGGTACAC
CGCTACTGCCAGTGCAGAGCAACGGGCTATGATGGCTGCGCAGGTTGTAGAGTCAA
GGAGACATGTTCTTAATGGTGACTGTACTAAGTACAATGAGGCAATCGACGCAGAC
ACACTGCTAAAAGTGTGGGATGCAATAGGCATGGGGTCAATTGGAGTCATGCTCGC
TTACATGGTGCGCAGGAAGTGCCTTCTCATTAAAGACACTCTAGTAGAGTGTCCAG
GAGGTATGTTGATGGGAATGTTCAACGCAACTGCCACCTTGGCACTGCAAGGGACG
ACTGACAGATTCCTGTCTTTCAGCGACGACTTCATAACATCGTTTAACTCGCCCGCT
GAATTACGCGAGATAGAGGACCTGCTCTTCGCAAGCTGTCATAACTTGTGCTAAA
GAAGAGTTACATTTAGTTGCCTCACTGGAAATAAACTCGTGTACCCTCACTAGGG
ACGGTGACCTAGCCACAGGGTTAGGTTGCACTGCTGGTGTCCCCTTCAGGGGGCCA
CTTGTGACTCTGAAACAGACTGCAGCTATGTTATCTGGCGCTGTTGACTCAGGAGTT
ATGCCATTCCATTCAGCAGAACGTCTGTTCCAGATAAAGCAGCAGGAATGTGCCTA
TAGGTATAACAACCCCACTTACACAACGAGGAATGAGGACTTCCTCCCCACATGCC
TGGGAGGGAAGACTGTAATTAGCTTTCAATCTCTACTGACTTGGGATTGTCACCCAT
TTTGGTACCAAGTGCACCCTGATGGCCAGACACTATAGATCAGAAAGTCCTATCT
GTCCTTGCCTCAAAGACTCGCAGAAGGAGAACCCGACTGGAAGCTCTCTCAGATTT
GGACCCCTGGTCCCTCATAGGCTTCTCGTTTCAGAGTCAGACGTTAGCAAGATTAG
GGCAGCTAGGCAGGCTCACTTGAAATCTTTGGGTTTAGAACAACCCACAACTTTA
ACTAT

Segmento 2: consenso_AKE 105

TTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAA
GCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATC
CCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGAAATTTAGGTAGAGGATCGCATCACCATC
ACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCCATGGGTGAGTTTGGGAAATCATTCAAGGGC
AGAAGTGAAGTCACAATAACCGAATATCGCTCCCATACTGTCAAAGATGTGCACAG
AAGCTTACTTACGGCTGACAAATCTCTAAGAAAGTCATTCTGCTTTAGGAACGCCCT
AAACCAGTTCTTGGATAAAGACTTGCCCTCTCTGCCCATTTCGGCCAAAATTAGAATC
CAGGGTTGCTGTGAAAAAGTCTAAGCTGAGGAGTCAGCTGTCGTTTCAGACCCGGTT
TAACTCAGGAGGAAGCAATTGATCTTTACAACAAGGGCTATGATGGTGACAGCGTC
TCAGGTGCCTTACAAGATAGGGTAGTCAATGAGCCTGTAGCTTACTCGAGCGCAGA

TAATGATAAATTTACAGGGGCTTAGCGGCTCTAGGGTACACTTTGGCTGATAGAG
CATTTGATACGTGCGAATCCGGCTTCGTGAGAGCAATCCCTACCACTCCATGCGGG
TTCATATGTTGCGGGCCAGGTTCTTTCAAAGATTCACCTTGGATTTGTGATAAAAATC
AGCGAATTCTGGCACATGTATGACGGGTTTCAACACTTCGTCGCCGTGCGAAGATGC
TAAGTTCCTAGTAAGTAAGTCTCCTTCGTTTTGGTTGGCAAACGTCTTGCAAAGAG
GCTGAATCTGGTTCCAAAAGAGGATCCATCTGTAGCAGCAGCTGAGTGCCCTTGTA
AAAGAGTGTGGGAAGCTAGTTTTGCTAGGGCACCTACTGCACTAGATCCATTTGGA
GGTAGGGCCTTCTGCGACCAGGGTTGGGTGTACCACAGGGACGTAGGGTATGCAAC
GGCTAACACATATCACAGGAGACGCTTTTTCAACAAGCGCTTTCAGTGAAGAACC
TTGGGCCGCAAGGTAGTGCAAATGTCTCAGGCTCAATACATACCGCCCTGGACAGG
CTCAGAGCAGCATATAGTAGGGGAACGCCCGCTCTAGATCCATACTGCAAGGGCT
TGCAAATCTCATCACACCTGTAGGTGAGAACTTTGAATGCGATCTCGACAAGAGGA
AGCTCAATATAAAGGCATTACGTTCTCCCGAGAGGTACATTACGATAGAGGGCCTG
GTTGTAAACTTGGACGATGTGGTCAGAGGGTTCTACCTTGACAAGGCGAAGGTCAC
TGTCTCTCGAGGTCAAAGTGGATGGGTTACGAGGACCTGCCCCAGAAACCTCCAA
ACGGTACATTTTACTGCAGAAAGAGGAAGGCAATGCTTCTAATCTCATGTAGTCCA
GGTACGTACGCAAAGAAGCGAAAAGTGGCAGTGCAGGAGGATCGTTTTAAAGATA
TGAGGGTTGAGA

Segmento 3: consenso_AKE 108

ATGGACTCGCGGTTTGCACAGCTAACTGGGGTTTTCTGTGACGATTTACCTATAGC
GAAGGGAGTCGAAGGTTCTAAGTTCGTACAGTACAGTGGAGAGACGTCCAGGAG
TCCCCGTAGAGGGTGAAGTGTATGACTGTTTGAAGAATAAGTGGATTGCCTTCGAG
CTGGAAGGCCAGCCGCGGAAATTTCCAAAGGCAACAATTCGTTGTATTTGAACAA
TGATGCCACATACGTTTGCTCTGAGCAAGAGTACCAGCAAATTTGTAAGGTACAAT
TCAAGGACTATTTAGAGATCGATGGGGTTGTTAAAGTTGGGCACAAGGCATCCTAC
GATACTGAGCTAAGGGAACGGCTATTGGAGCTACCACATCCAAAGAGTGGCCCGA
AGCCTCGTATCGAGTGGGTGGCACCACCCAGGCTTGCGGACATATCCAAAGAAACA
GCTGAGCTAAAGAGGCAATATGGATTCTTCGAGTGCTCAAAGTTCCTCGCCTGCGG
TGAGGAGTGTGGTCTTGACCAAGAGGCAAGAGAAGTATACTGAACGAGTACGCA
CGTGACAGAGAATTTGAGTTCGCAATGGAGGGTGGATACAAAGGTACACAGTTGC
TTCTCATAAGCCTGCTACACAGAAGATATTGCCTCTACCGGCTAGTGCCCACTTGC
TCGTGAGCTTTTGATGTTGATTGCTAGGAGCACAACCTCAGGCAGGGAAAGTGCTGC
ATAGCGACAATACCAGCATACTAGCTGTACCGGTCATGCGCGACTCTGGAAAGCAC
AGTAAAAGGAGACCAACCGCCTCCACTCACCCTTAGTTGTAGGTCTAAGTAAACC
TGGCTGTGAACACGATTTTGAAGTTTACGGGTACAGGGCAGCTGTGCATGTGATGC
ACTTAGATCCTAAACAATCGGCTAATATAGGGGAGCAGGACTTTGTGAGTACCCGA
GAAATTTACAAGCTGGATATGTTGGAAGTACCTCCATAAGTAGGAAGGGTGTATCT
GGACAGAGCTAGTGGTCTTGAGACAAGATGGGACGTCATCTTACTTTTGAAGTCC
TCGACTCTACAAGGGT

Segmento 4: consenso_AKE 139

ATGGTGAGAACTACAAAGACTAGTATGGCAGCTGCCAGCACTGTTGCACCAGAGGT
AGCAATGGATGAAAGTTCACCCAGCACTTCGCAGGCACAAGTTGAGCTCTCAAGAA
ACCTTGAGGTTTTCAATGAAGCTTGTGGTCATGTGTTTGAAGCTCCTTTAACAGGG
AGGATAACAGTGTGATATCTGATGCTGCTGCATTCTCTTTAAAATGCATACTCACT
CCCTTGATGGTCAGGAGGCTAAGGTTCTGAGAGCCAGTGAAAAGAAAAGGGAGAG

GGAGAACGCTAAGAAATCAAGGAAGGCACCGGAGGCAGCGATGAGTGTCCGGAAG
GAGCCTTATATTAACCAGCAGATGGACTGAATACTGCGCAACCTGTGTGCCTGCAC
TGGGCTCAAAGATGAAGGTGATAAAAGCCTCAGGGGACGCAGCTATGATTCAGAT
GATGAAGGACCATAACTCTCTATTGAGAGTGTGTGTTTCGCATTGAGGTCTGGAAGG
CTAGGTACGTCAGTTTGGTTGCTCTCGACGAGAGGATTCAGACTTTGGAGGATGCT
CAGTGGTTCCCATACCTGAGTGGGGATTCTATCGTGCTTGCCCAGGGCTGGTTGGT
GGCTACTTTGCAAAGAAAGCAGCAGCAGGAGAAAGAGGAAAGAACTACAAAAAGT
TGAATCAGACTGCTATAATCCCGCCTCCGAGATTTCTGATCATCGGCCACAGGCTGC
AGATAGGCGACCAGGTCACCCTCAGGGAGCTGCTTGCCCAATTGCTTGGGGCCTT
TGCGACGGTGTCTTGCTGAGTGTGGAGCCCCTCACAGGGGGACGGGAGTATTGG
TGTTGTTGTTGGTCTACCTCTGCAGGCTACAGGAAGCTGCTTCCTGGTGGTAG

Segmento 5: 3bRVpEGH_AKE110

ACTCCAATAGCTATGCAGGCGCTGGTCCTGATAAGCTGCCTAGTTTGCGCACTAGC
AAGTGATGAAAGTTTAAGGATAAAACGATTGCAATCGTACCTAAACAATACCTACC
AAAGTAGGGAGATAGAAAGTGAAATAAGGCGCGGATTTGCATCCAAGTTCAGGAT
GGAAAGTTGCTCTTGC ACTATGGGGGTGCACTACATTGTAACCCCATCCTCGGGTG
GGTCGTTCTGTACTGGGTACATGCAGTACCTAACAGCTTCCCAGCCCTCGGGTACA
AACTTCCCAAAGCAGGGGGAAGAGGTGATTGGAGAGCTACTGAAGTTAGGATTGA
CGAAGATAGCGGGGTTGTCCTATAACAACGTTTCCAGGTGCAGCCACAGTAGCGAGT
GCAGAGATTTGGAGGTGTATTCCACCGTACTGCCAGGTCAGTGTGACTGCTCCAGA
CCCACCGTGGACGACTACAAGACCATGCTGGCCTCAAGGCAGCCGAAGTCGTTTGT
AGTAGCAGGCCTCATTATACTGTGTTTACTTGCTAGCTCAGTAGCAATTGGCATGGG
TGTTTACAATTATGCTGGGGTCATCGGCCTAGCGGACGCAGCTCAAGCAGATGTTT
CTGAGATCTGGGAGTATTTGGAAGCTTTGACACGGGAAGTCACCGGTATGACGCTA
GGAGAGTTTTGCTCGATTAATCCCTCGTCTGTAAATCTGATAACATAGGTAAATTC
AAGGAGCAATTTGCAGCCTTTGGGGAAGCTATTCTTGCAATAGTGTGGGATGCT
AGAGAAATACAAATTTGTCTATTACCTGGTGCTTTCAGTATGGTTCTTTTCATTGCT
CAGTAACTTGTTTCTCTGTTGAAGCAGGTGCCCTTCTATGGGAGTATCAAAGTTTT
AATATCCGGAGGCTAAGAGTTGTGTGTTTCAAG

Segmento 6: pEGH9145FW_AKE115

ATGCATTTTTATCTACAGGATTACCCAATGAGTTGGCTTAGGGTGATAAGAACCCTT
ACTTTGTTTTCAACACTCTTTAGCGAAAGCGATCAATGCGTGGACAATATGTGGCG
GTTTTACGGGAGATCAAACACTACACGTCAAGTG TAGTTATTGACGGGGACGAATACT
CTGTTGAAGGTTTCATATTCGAGTAGTGATTATCTGGATCCAGCAGTACAGAAGGTG
GTTCTGGGACTTGATGGTAGCAACGAGATCATAGACTCAGGTGGGTCTCCATACTA
CATGTATGATTTAGAGGGATCAAAAGGGGAACCTCCATCATCTGAACTGCAACTTTG
TCGAGAAACGATGTAATCCGACGCTGAACTTTATGCTTGGAGGATTTGTTTTGTGCC
CGGGAATATCGAGAAAGGAACTGGAGCCTGTAACCGACAAGATACTGGAGAGCCG
GGGAATACCGGGCCGAGGTAAAATACTTACTATAAAAATAAGCTCTAAACTGTTTG
AGACATCGCTGTGCCTTTCGAAGAGGAGGCCATCTTTAGCACCTGTATGCTAATGT
CGCGTGGTCTTTGTACAAACTGTAAACGTACTATAGATAGAACATATATGACGCAA
AACGGCTTCAGAACTGAATACAAGTGGAGCTGCAGAGACAATAGTACAAAACAGT
GTTGGATATTAGTTGAGTCACTGGAGGAGAATCACTCCCCATACAAGTGCCACTTTT
CCGCAGTGGAAGTCCTACTACCAGCCGAAATAAAGCGTCGCCAGCTCATCAGCGAG
TGGTCTGCAATGCAGGATGAAGTCGCTTATAAGAAGTCAAATGCTTATCTTCTAGCT

CGTACTTTTCTCAGCTACACAAAAATGCGTAGATTGAATCCTGTAATCGATCTTTCA
A-ATCA-CACCAGTAACAGTAAGATCCGGCTGTAAATCATAAAAAACATGGGA

Segmento 7: pEGH9145FW_ AKE111

ATGTCCTACAAGATTGGTGAGCTTGAGAGAATTATCACGCGTAAGAACACCCTCCC
CAAGGACAGTGGGAGTCAGACTGGGCTGTTCCATCGACTGCTCTTAGAGCATTACT
CTGGTGCTTCGAACGTATGGTCTTTTGTGCAACTGGGTTTACACCCAATACAAATG
GCACAACCTGGATTGTATTGACGAGTCACCCAACCGATGGTGGAGAAAAGGTACCT
TTGAAATGGAAGTACGAAGTGAGCCCCGGATTGCCAGTCAGAAGGGTACTTGCCCA
AGAGGGTACGGCAGTAAGAGGCCCTAAGGGAGCCTATCTAGTCAAAGGAGACATG
CATCTCTGTTCAACTACCTTCTACACTAGAAGGGAAGCGAAGTACTGGCTCTGTGC
GCCATCTCCAAAGCTTCCACACTGGACCAAGAGATCAGCGCTGGTGACCAGCACCC
GACCACTGACTGAGTTGAGCAGGGTTGCCACATACCTAGAGGCCATAAGTAAGGGT
GCAACTGATGTCAATGAATCGTGGTGTTCCTACCACAGAGTTGGGTTAGTGCCAAT
CCCTAAAGGGATCACATTTGAACTCTAA

Segmento 8: pEGH9145FW_ AKE119

CATGGCTCAAATGCCAACACTAAGAGAGGGGCCAAGGGAAGCTCTACGATTTACGC
TCAACGGCATGACAGTGACTAGAGACACAGTCAACACTGTAGTTGCTCTGGAGTTT
CTTGTC AATGCAAGTCCAGATTTGCTTTCCTAACAATTGGCGAAGGCCTCTCAGAA
GAAACAAAGTTTAAACACCTGCTTGTTAAGCACGCCGGCATGACCCGAAAGCGGAT
AGAGGAAAGGCTGGGACGAATCTCGAGGCGAGTCAGTGTGACAGTCGACGCAATT
ATAATAACAAACCGCAAGGGTCAAAGATTTGAATTCAATCGAAAACAGTACCTGG
ATATTGCCAAACAAGCTATGAAGCTTAAGCTCCCTGGGATTAAGTGTGTCGACATA
CCCCTGCGCTCGCTTTTCTCGAGGAAGTCTGGCAACTGCTTTGAAGGACACTGA
AGGTTCAAAAGATGACAGGATGGCCCTTAAGGCAGACACTTCTGCTGCTATCAACC
ATTTCCGTGAAATGCTTAAATAA

Segmento 9: pEGH9145FW_ AKE

ATGTCACGATGGATAGAAAATACAGATTCTGTGTCAGTAATCTTGACAGAGATGAG
TCGGTCGTACGTCACCTTGTGCCATTACCCCCCTTGGAGCTTGTGCTGCGGCGGCAA
GACATCACAACCTGGTCAAATCTGGATCCTGGATCGAAAACATTGTCTAGGATGTT
CAGAGATCTCAGAGTTAATGACACTAGGTCAAACAACCTGGCAGGAGAGTGCAAT
GGTGATAGGGAGCTGGGTCCAAGTAGTAACGGAGCACGGAATTTTGCACACTTCAA
CGTCGAAAGGCAGGCGCCAAGAAGGGTCATGTGGAGGATCTCTGACATGGCTGG
CGATAGAACTTTATGA

Segmento 10: pEGH9145FW_ AKE114

TGGATCCCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGGAATTCTAGGTAGAGGATCGCATC
ACCATCACCATCACGGTGGTGGTCTAGACTCCATGAGTGTGGCAGATTATTTGTCG
AGTGACAGTGATTCGGGGGCTGAGAGCTCAGGCTGTTTAGTACTAAGAAGTTCGGAA

GGTCAAGAAGAGCAAGAAAGCTGCTTCAAAGAAGCGAAGTTGGAAGAATGAAAGG
TATGGCGCTGACGAGAGCGGTGAAGATAACATAGAGTGGGGTGACGAAGTCGACC
TCGAGATGGACGACTGTGATTCTGCAATCCCAGAGTGGGCTAGGGTTGATTTCAAT
CCCAAGAACAGAAGGGACAGAGAGGATGATGGGCAGAGTGACCTATCTCGATTTT
CCGAAGATTTTCGAAAGAAGTCTCTTGACGTGCAGTCTTAG