



FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN  
BIOLOGÍA O QUÍMICA

**SECUENCIAS GENÓMICAS DE VIRUS IPN AISLADOS EN CHILE:  
VARIABILIDAD GENÉTICA Y SU RELACIÓN CON EL  
DIAGNÓSTICO**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADA EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA

**Paz Alejandra Morales Tapia**

**Director: Dr. Juan Kuznar Hammarstrand**

**Codirector: M. Cs. Juan Carlos Espinoza Ibáñez**

Valparaíso, Chile

2014

## Agradecimientos.

Para comenzar quiero agradecer a mi familia, quienes siempre me han apoyado en todas las decisiones que he tomado. Alguna vez ya agradecí a mi madre por darme alas para volar, entendiendo lo que significa la Libertad y el respeto, mas en este momento quisiera extender el agradecimiento a ese núcleo grande y compacto que somos como familia.

A todos los profesores y profesoras que también han aportado para que ser la que soy hoy. A quienes demuestran y traspasan el amor por el saber, invitándonos a este hermoso espectáculo al que llamamos conocimiento. Para ellos y ellas, sepan que para mí fue un festín asistir a sus clases y escuchar esas historias en las que nos contaban, entre muchas otras cosas, cómo se ha ido construyendo el camino de las ciencias. Gracias a todos ellos y ellas continúo entendiendo por qué la ciencia es revolución.

También a todos mis amigos y amigas que han sabido acompañarme en momentos de celebrar, compartir, discutir y acompañarse. Cada experiencia es una oportunidad para crecer.

Finalmente, y a modo de reconocimiento universal, quiero enviar agradecimientos a todas aquellas personas que cada día utilizan su vida como herramienta de cambio, utilizando su energía para que tanto sus vidas como las de otros puedan ser un poco mejores. Para todos aquellos que guardan esperanzas y siguen luchando para que éste sea un país y, por qué no, un mundo mejor.

La ciencia es la trinchera que he escogido para dar esta batalla, ahora sólo me resta seguir viviéndola.

*“Las letras y las ciencias no tomarán su verdadero lugar en la obra del desarrollo humano hasta el día en que, libres de toda servidumbre mercenaria, sean exclusivamente cultivadas por los que la aman y para aquellos que las aman”*

Piotr Kropotkin – La conquista del pan

## **Resumen.**

En los últimos años, Chile se viene posicionando como un país de grandes exportaciones relacionadas a la acuicultura, actividad que se suma a las históricas producciones de cobre, madera y productos agrícolas. Este es el caso del cultivo de salmónidos, industria que en las últimas décadas ha crecido al punto tal de convertirnos en el segundo mayor exportador de salmónes a nivel global, superados sólo por Noruega. El cultivo de especies es mayoritario para salmón del atlántico, y en menor cantidad, trucha arcoíris, salmón coho y salmón chinook. Éstos pueden ser afectados por diversas enfermedades, como la Necrosis Pancreática Infecciosa, la cual es provocada por un virus.

El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) es un virus icosaédrico desnudo, de monocapa proteica que posee dos segmentos de RNA de doble cadena. Estos dos segmentos codifican 5 proteínas que distribuyen sus funciones como polimerasa y estructurales, principalmente. Es altamente infectivo y algunos estudios indican que la mortalidad puede llegar a sobrepasar tasas de 90%, siendo los individuos juveniles en su etapa en agua dulce los principales afectados.

Para diagnosticar al virus, organismos internacionales han estandarizado metodologías relacionadas a la amplificación del virus en líneas celulares y la aplicación de pruebas serológicas. Además es ampliamente utilizado el qRT-PCR, técnica que permite identificar la presencia del virus rápidamente.

Esta última técnica puede presentar dificultades relacionadas con la complementariedad entre las secuencias blanco y los partidores, debido a la alta variabilidad del virus. Esto es común para todos los virus y especialmente para aquellos que presentan su material genético en forma de RNA. Para sortear estas dificultades sus secuencias han sido estudiadas con el fin de encontrar sitios conservados, sobre los cuales diseñar partidores para su uso en PCR.

En el presente estudio se secuenciaron ambos segmentos virales completos de doce muestras provenientes de pisciculturas del sur de Chile. Las secuencias fueron utilizadas para determinar la filogenia de los virus tanto por el segmento A como por el segmento B,

comprobándose que en nuestro país aun se presentan sólo los genogrupos 1 y 5, correspondientes a procedencias de Norteamérica y Europa, respectivamente. También se observa que, hasta el momento, no se presentan reordenantes en nuestras aguas.

Otro análisis que se realizó a las muestras guarda relación con encontrar aquellas variantes que dificultan la detección del virus mediante la técnica de PCR. Para esto se compararon las secuencias utilizadas como partidores, propuestos por diversos autores, con las secuencias blanco de los virus analizados en este estudio. Se encontró que, en términos generales, los partidores utilizados están diseñados sobre zonas conservadas para un genogrupo y las diferencias con el otro genogrupo se presentan uniformemente en todas las secuencias trabajadas, es decir, la misma diferencia se presenta en todas las secuencias del genogrupo en cuestión. Conociendo estas diferencias es posible generar o modificar partidores que cubran de forma más amplia a todas las variantes presentes en el país y así facilitar su diagnóstico en el futuro.

## Índice

<b><u>1. INTRODUCCIÓN.</u></b> .....	<b>8</b>
1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA Y DEL VIRUS QUE LA PROVOCA.....	9
1.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO. ....	15
1.3 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO. ....	17
1.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	21
<b><u>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.</u></b> .....	<b>22</b>
2.1 HIPÓTESIS. ....	22
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	22
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	22
<b><u>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</u></b> .....	<b>23</b>
3.1 MUESTRAS. ....	23
3.2 EXTRACCIÓN DE RNA.....	24
3.3 MEDICIÓN DE CONCENTRACIÓN DE RNA.....	25
3.4 CURVA DE CALIBRADO DE TEMPERATURA DE ANNEALING PARA PARTIDORES A-A5EJ'NC* Y A-IPNVEJR* PARA AMPLIFICACIÓN DEL SEGMENTO A COMPLETO. ....	25
3.5 RT-PCR DE SEGMENTOS A Y B COMPLETOS .....	26
3.6 ELECTROFORESIS. ....	28
3.7 PURIFICACIÓN DE cDNA .....	28
3.8 SECUENCIACIÓN.....	29

<b>3.9 ENSAMBLAJE DE SECUENCIAS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.10 EDICIÓN DE SECUENCIAS.....</b>	<b>31</b>
<b>3.11 CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.12 COMPARACIÓN DE TEMPERATURAS DE MISMATCH DE PARTIDORES UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>32</b>
<b><u>4. RESULTADOS.....</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b>4.1 EXTRACCIÓN DE RNA Y MEDICIÓN DE SU CONCENTRACIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 CURVA DE CALIBRADO DE TEMPERATURA DE ANNEALING PARA PARTIDORES A-A5EJ'NC* Y A-IPNVEJR* PARA AMPLIFICACIÓN DEL SEGMENTO A COMPLETO.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3 RT-PCR DE SEGMENTOS A Y B COMPLETOS Y ELECTROFORESIS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4 PURIFICACIÓN DE CDNA Y MEDICIÓN DE SU CONCENTRACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5 SECUENCIACIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>4.6 ENSAMBLAJE DE SECUENCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.7 EDICIÓN DE SECUENCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.8 ÁRBOLES FILOGENÉTICOS.....</b>	<b>44</b>
<b>4.8.1 MOTIVOS DE VIRULENCIA.....</b>	<b>49</b>
<b>4.9 COMPARACIÓN DE TEMPERATURAS DE MISMATCH DE PARTIDORES UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>50</b>
<b><u>5. DISCUSIÓN.....</u></b>	<b><u>54</u></b>
<b>5.1 EXTRACCIÓN DE RNA Y MEDICIÓN DE SU CONCENTRACIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>5.3 CURVA DE CALIBRADO DE TEMPERATURA DE ANNEALING PARA PARTIDORES A-A5EJ'NC* Y A-IPNVEJR* PARA AMPLIFICACIÓN DEL SEGMENTO A COMPLETO.....</b>	<b>55</b>
<b>5.4 RT-PCR DE SEGMENTOS A Y B COMPLETOS Y ELECTROFORESIS.....</b>	<b>55</b>
<b>5.6 PURIFICACIÓN DE CDNA Y MEDICIÓN DE SU CONCENTRACIÓN.....</b>	<b>56</b>

<b>5.9 EDICIÓN DE SECUENCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>5.10 ÁRBOLES FILOGENÉTICOS.....</b>	<b>59</b>
<b>5.10.1 MOTIVOS DE VIRULENCIA.....</b>	<b>60</b>
<b>5.11 COMPARACIÓN DE TEMPERATURAS DE MISMATCH DE PARTIDORES UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>61</b>
<b><u>6. CONCLUSIONES.....</u></b>	<b><u>63</u></b>
<b><u>7. REFERENCIAS.....</u></b>	<b><u>64</u></b>
<b><u>8. ANEXOS.....</u></b>	<b><u>70</u></b>
<b>8.1 SECUENCIAS DE REFERENCIA UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO.....</b>	<b>70</b>
<b>8.2 PARÁMETROS PARA ENSAMBLAJE DE SECUENCIAS POR CADA ENSAYO.....</b>	<b>73</b>
<b>8.3 SECUENCIAS COMPLETAS DE SEGMENTOS A Y B.....</b>	<b>74</b>

## **1. Introducción.**

Nuestro país, Chile, se caracteriza por tener una vasta variedad de actividades económicas relacionadas a la explotación de los recursos naturales. Una de las industrias que ha cobrado gran relevancia en las últimas décadas es la relacionada a la acuicultura y más específicamente al cultivo de salmónidos. Ésta corresponde al 4to contribuidor de la economía nacional y obtiene el segundo lugar de exportación a nivel mundial, sólo por debajo de Noruega (Buschmann 2009). De hecho, su exportación se robusteció progresivamente en alrededor de una década, pasando de 38 millones de dólares el año 1989 a 964 millones de dólares en 2001 (Montero 2004).

Los salmónidos son especies no endémicas del país. Comenzaron a ser introducidos a finales del siglo XIX con la finalidad de fomentar la pesca deportiva en el sur de Chile, actividad recreativa común en los países nórdicos. Posteriormente, en los años 70', se realizaron diversas iniciativas de cooperación entre organismos públicos nacionales, norteamericanos y japoneses a fin de estudiar las zonas hídricas más aptas para su cultivo, sin embargo pasaría una década antes de que el país asentara su productividad y pasara a formar parte del selecto grupo de países dedicados a la exportación de este producto (Montero 2004). Debido a que la expansión de esta industria no contaba con una regulación por parte de organismos estatales, ya que hasta entonces no había políticas de estado explícitas ni formales para el aumento de su producción, su explosión se tradujo en una gran cantidad de permisos, generando una alta densidad de cultivos sin que hubiera regulación ambiental o sanitaria (Buschmann 2009). De esta forma los centros de cultivo importaban ovas libremente, desconociendo que, junto con los peces, se podían estar importando agentes patógenos que afectan a éstas y otras especies (Espinoza *et al.* 1985).

Así la industria salmonera del país creció carente de regulaciones hasta el año 2000, año en que se añaden restricciones a la importación de ovas y posteriormente entran en vigencia los Reglamentos Sanitario y Ambiental para la Acuicultura, los cuales contienen medidas que contemplan la protección, control y erradicación de enfermedades que

afectan a especies hidrobiológicas, además de controles obligatorios para mantener la calidad ambiental de las aguas (Montero 2004).

En los últimos años la biomasa total cultivada ha seguido creciendo a pasos agigantados, llegando a un nuevo máximo histórico de 600 mil toneladas en Octubre del año 2012, superando el máximo histórico anterior del año 2008, en que se sobrepasaron las 500 mil toneladas. Esta producción se encuentra distribuida en tres regiones del sur del país: un 52,28% de la producción proviene de la región de Aysén, un 43,22% de la región de Los Lagos y un 4,50% de la región de Magallanes. En cuanto a la distribución de especies cultivadas, el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca) informa que un 73,48% corresponde a salmón del atlántico (*Salmo salar*), 15,49% trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), 10,96% es salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y tan solo un 0,07% de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Sernapesca 2014). Las tasas de muerte que presentan los centros de cultivo, han llegado a un máximo de 1,8% en Febrero del año 2013, dentro de la cual la mortalidad secundaria o infecciosa es la primera causa.

Dentro de las enfermedades infecciosas que afectan a la salmonicultura, se encuentra la enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), producida por el virus que motiva este estudio y que solo para el año 2013 representó un 32,7% de los diagnósticos. Éste constituye la segunda mayor causa de mortandad en salmón del atlántico y la cuarta para la trucha arcoíris y el salmón coho (Sernapesca 2014).

### **1.1 Características de la enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa y del virus que la provoca.**

Esta enfermedad fue descrita, en un comienzo, como una enteritis catarral aguda que afectaba al estadio de alevín y durante muchos años se creyó que sólo podía afectar a salmónidos cultivados en cautiverio. Estas primeras observaciones de la enfermedad fueron hechas en Norteamérica el año 1940 y no sería sino hasta mediados de los 80' que comienzan a describirse brotes de la enfermedad en cultivos de países europeos (Woo y

Bruno 2011). Al día de hoy se sabe que este virus puede encontrarse en diversas especies acuáticas, incluyendo otros peces, anguilas, moluscos y crustáceos. También hoy se sabe que su distribución geográfica es más amplia de lo que se creyó en un inicio, ya que abarca a Norteamérica, Sudamérica, Europa, Asia y Oceanía (Crane 2000, Hill y Way 1995, OIE 2009).

Las primeras manifestaciones de la enfermedad se dan por observación de individuos que presentan signos clínicos característicos de su desarrollo: bajas considerables en el peso, patrones de nado anómalo, abdomen distendido, exoftalmia, agallas pálidas, pigmentación oscura de la piel y petequias hemorrágicas en la superficie ventral del pez. También, internamente, puede encontrarse una evidente falta de alimento en el tracto digestivo, acompañado de una secreción mucosa blanquecina y órganos como bazo, corazón, hígado y riñón aparecen anormalmente pálidos. Finalmente, mediante examen histopatológico, pueden observarse lesiones necróticas localizadas en el tejido pancreático exocrino (Santi *et al.* 2004, Woo y Bruno 2011).

Esta enfermedad es especialmente mortal en individuos jóvenes en su período en agua dulce y tiene una alta prevalencia en peces en cultivo. De hecho ha sido catalogado como una de las causas de pérdidas más importantes de la industria salmonera, ya que algunos brotes pueden llegar a alcanzar el 90% de mortalidad. A medida que los peces van creciendo la mortalidad decrece y se hacen resistentes al desarrollo de la enfermedad. Los peces infectados que sobreviven quedan como portadores asintomáticos del virus, los cuales pueden transmitirlo tanto vertical, como horizontalmente (Guerrero 2008, OIE 2009, Rimstad 2003).

Desde el año 1957 se conoce la naturaleza vírica de esta enfermedad (Ortega y Enríquez 2007) y desde entonces el virus ha sido crecientemente estudiado. Éste es un virus icosaédrico de solo una capa de proteínas en la cápside, sin cubierta lipídica, cuyo material genético consta de dos segmentos de RNA de doble hebra (dsRNA) (Dobos 1995, Santi *et al.* 2005). La figura 1.1 muestra un esquema del virión con la ubicación de sus proteínas. En nuestro país ha sido reportado desde el año 1984 (McCallister y Reyes 1984) y en primera instancia su introducción se relacionó a la cepa VR299 de origen norteamericano (Espinoza *et al.* 1985), sin embargo estudios posteriores han demostrado

que también conviven en las aguas chilenas cepas de origen europeo (Mutoloki y Evensen 2011).

Su estabilidad en diversas condiciones ha sido estudiada y se ha demostrado que puede mantenerse activo a temperaturas de entre  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $20^{\circ}\text{C}$ . Sólo ha mostrado sensibilidad a cambios bruscos de temperaturas, como congelamientos y descongelamientos sucesivos. Además ha sido probada su estabilidad a distintas condiciones de salinidad y se ha comprobado que puede permanecer activo en un medio salino de 0 a 40% sin verse afectado. Tampoco le afecta la exposición al éter, cloroformo o glicerol, pero es rápidamente inactivado por cloro, yodo o radiación ultravioleta y su infectividad va decayendo progresivamente con la exposición al ozono, formalina, secado y pH extremos como 2,0 o 12,0 (McAllister 1983, Mortensen 1998).

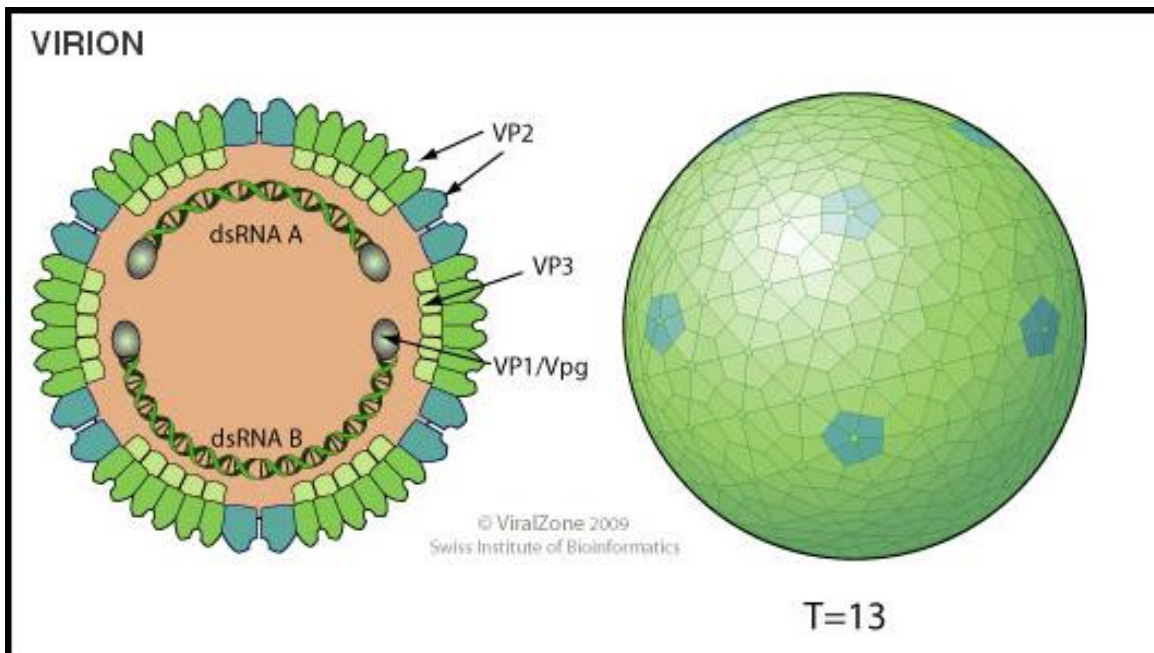


Figura 1.1: Esquema de un virión de IPNV que muestra las ubicaciones de las proteínas virales. (ViralZone)

Sus dos segmentos de dsRNA han sido caracterizados y se han mapeado sus genes (Blake *et al.* 2001, Dobos 1995, Romero-Brey *et al.* 2009, Santi *et al.* 2004, Yao y Vakharia 1998). El segmento mayor, segmento A tiene un largo de 3097 pb (Yao y Vakharia 1998) y posee dos marcos abiertos de lectura (en adelante ORF). El más extenso de ellos codifica para una poliproteína de 106 kDa que da origen a las dos proteínas de la cápside (la más grande y mayormente expuesta al exterior, VP2, y la menor VP3), además de una proteína no estructural (VP4), la cual cumple la función de proteasa (Dobos 1995). La poliproteína es traducida de la forma NH<sub>2</sub>-pVP2-VP4-VP3-COOH y es cortada por la misma VP4 entre los aminoácidos 508-509 para la unión pVP2-VP4 y 734-735 para la unión VP4-VP3 (Santi *et al.* 2004). Una serie de cortes posteriores producidos por proteasas de la célula infectada, generan a VP2 a partir de su precursor pVP2 (Skjesol *et al.* 2011). En la formación del virión, VP3 coordina interacciones tanto con VP1 como con el dsRNA, para montar la parte interna de las partículas virales, y a la vez interacciona con subpartículas virales formadas por 20 trímeros de VP2, para dar forma al virión en su parte externa (Bahar *et al.* 2013, Coulibaly 2010).

El ORF más pequeño, ligeramente solapado al ORF mayor, codifica para otra proteína no estructural llamada VP5, la cual tendría actividad anti apoptótica (Santi *et al.* 2004). Sin embargo, un estudio posterior indicaría que esta proteína no es indispensable para la replicación del virus ni está implicada en factores de virulencia (Santi *et al.* 2005). Los motivos de virulencia descritos en la literatura se han relacionado con el segmento A, sin embargo éstos serán revisados más adelante.

El Segmento B, ligeramente más pequeño que el segmento A, tiene un largo de 2783 pb (Yao y Vakharia 1998) y tiene un ORF que codifica para una proteína no estructural llamada VP1, la cual tiene actividad de RNA polimerasa dependiente de dsRNA (RdRp), por lo que el virus es capaz de replicar su material genético por sí mismo, y se encuentra unida covalentemente a los extremos 5' en ambos segmentos (Dobos 1995). Ambos segmentos han sido secuenciados completamente en diversos estudios (Romero-Brey *et al.* 2009, Santi *et al.* 2004, Yao y Vakharia 1998). La figura 1.2 presenta un esquema de la distribución de los genes en ambos segmentos del virus.

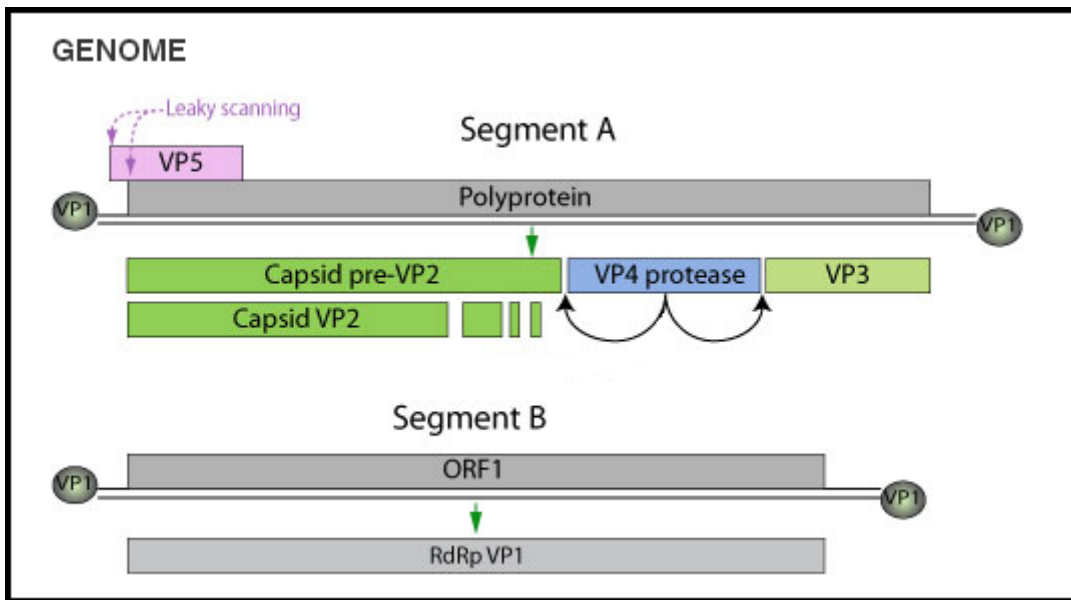


Figura 1.2: Esquema de la distribución de los genes de ambos segmentos del virus IPN. (ViralZone).

Este virus ha sido clasificado tanto serológica como genóticamente. En primera instancia fueron identificados dos serogrupos. El serogrupo A contiene 9 serotipos patógenos y el serogrupo B, que contiene sólo un serogrupo. Sin embargo, se indica que la clasificación genética tendría sus ventajas sobre la clasificación serológica, debido a que las comparaciones entre distintos laboratorios se pueden realizar más fácilmente, además de que serían más confiables (Rimstad 2003). Asimismo las secuencias de material genético pueden utilizarse para estudios de filogenia, los cuales consisten en relacionar evolutivamente las variantes dentro de una o más especies. Para el caso del virus IPN se han identificado siete genogrupos, a partir de la deducción de la secuencia aminoacídica del segmento A o del gen codificante de VP2 (Blake *et al.* 2001, Nishizawa 2005). VP2 ha sido elegida en estudios de filogenia debido a que presenta la mayor cantidad de epítopes que reaccionan con anticuerpos, además de ser la proteína más grande de la cápside (Blake *et al.* 2001). En nuestro país se presentan principalmente los genogrupos 1 y 5, los cuales corresponden a familias Norteamericanas y Europeas del virus, respectivamente. A continuación la tabla 2.1 presenta un resumen de los seis principales genogrupos descritos en la literatura y algunas características relevantes.

Genogrupo	Continente	Serotipos	Secuencias de referencia
Genogrupo 1	Norteamérica	A1 y A9	91-137
			Buhl
			Reno
			Ja-DOBOS
			VR299
			WB
			DM
Genogrupo 2	Norteamérica	A7 y A8	C2
			C3
Genogrupo 3	Europa, Asia	A3	Ab
Genogrupo 4	Europa, Norteamérica	A5 y A6	C1
			Te
Genogrupo 5	Norteamérica, Europa, Asia	A2	OV2
			DPL
			FR21
			N1
			FR10
			Sp
Genogrupo 6	Europa	A4	He

Tabla 1.1: Presenta un resumen de las caracterizaciones tanto serológicas como genotípicas del virus IPN. Construido con Blake *et al.* 2001, Dobos 1995 y Romero Brey *et al.* 2009.

## **1.2 Métodos de diagnóstico.**

Tanto para detectar, como para estudiar al virus se emplean técnicas que requieren de su aislamiento, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, originalmente Oficina Internacional de Epizootias) ha definido la metodología de diagnóstico mediante la utilización de aislados virales, seguidos de pruebas inmunológicas. Para esto se muestrean hígado, riñón, bazo y fluidos de los ovarios, para luego infectar células en cultivo (no se menciona el páncreas, debido a que los peces no presentan este órgano como tal, si no ciegos pilóricos con acinares pancreáticos). Las líneas celulares utilizadas son BF-2, derivada de individuos juveniles del pez 'Bluegill', RTG-2, derivada de gónada de trucha arcoíris y CHSE-214, la cual es derivada de embrión de salmón chinook. Ésta última suele ser la preferida para producir grandes cantidades de virus ya que no produce interferón, el cual es un mecanismo de defensa que se activa rápidamente ante la presencia de RNA de doble cadena (Dobos 1995). La amplificación del virus se realiza en monocapas celulares por debajo de los 24°C y un ciclo de replicación ocurre entre 16 a 20 horas post infección, pasado este tiempo se presenta el efecto citopático característico, en el cual se produce lisis celular, mas su observación puede tomar hasta una semana, dependiendo de la carga viral producida (Dobos 1995, OIE 2009, Rimstad 2003). De estos cultivos se pueden hacer subcultivos en una nueva monocapa celular para mantener virus activo para su estudio.

Una vez que se observa el efecto citopático, los aislados pueden utilizarse para pruebas inmunológicas o para detección mediante amplificación de material genético. De las pruebas inmunológicas son ampliamente usadas la inmunohistoquímica o la inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia es una técnica que requiere de amplificación viral mediante infección de células en cultivo para su ejecución y utiliza anticuerpos para detectar moléculas de interés, por ejemplo una proteína. El sector de la molécula que es reconocido por el anticuerpo se denomina epítome. Para llevar a cabo la reacción se utilizan dos tipos de anticuerpo: uno primario, el cual es monoclonal, es decir es específico a la molécula que se desea detectar, que para el caso del virus IPN se une a las proteínas que forman la cápside –VP2 o VP3-; y uno secundario, el cual se une al

anticuerpo primario y es el que lleva el marcador fluorescente. Posterior a la aplicación de los anticuerpos, se realizan lavados a fin de arrastrar a aquellos anticuerpos que no se han unido a su blanco. A continuación, la muestra es observada en microscopio de fluorescencia, donde el fluoróforo es excitado con luz a una longitud de onda específica. Cuando el anticuerpo secundario 'responde' emitiendo fluorescencia, quiere decir que ambos anticuerpos se han unido a su blanco, sugiriendo que el virus está presente en la muestra. Se han desarrollado procedimientos que permiten, en pocas horas, tanto detectar como cuantificar al virus presente en una muestra utilizando esta técnica. (Espinoza y Kuznar 2002).

Por otra parte, en los últimos años el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) ha sido cada vez más frecuente para diagnóstico de virus, debido a que no es necesario realizar la amplificación viral previa a su aplicación, por lo que los tiempos de detección se acortan significativamente. El qRT-PCR es una técnica que permite detectar el material genético del virus: 'RT' hace alusión a la retrotranscripción que debe efectuarse previamente (utilizando enzimas que replican de RNA a DNA complementario o cDNA) y 'q' indica que se puede cuantificar la carga viral presente en la muestra. Un valor importante de este tipo de ensayo es el 'Ct', el cual indica el ciclo en que la señal comienza a ser mayor al ruido de fondo y guarda relación con la pureza y la cantidad de la muestra. De ésta forma, bajos valores de Ct indican una buena cantidad de templado inicial y en conjunto con una amplificación exponencial hablan de una buena calidad de la muestra. El PCR comenzó a ser utilizado para detección de virus IPN por Rimstad en 1990, donde utiliza un RT-PCR anidado y destaca que la ventaja de utilizar esta técnica guarda relación con su sensibilidad, ya que fue posible detectar al virus a partir de 0,8 pg de dsRNA viral como templado inicial. El PCR consta de ciclos en los cuales se va variando la temperatura para amplificar segmentos del material genético. Para esto son utilizados partidores (o 'primers') que son secuencias cortas de DNA con un grupo -OH libre en el extremo 3', el cual le indica a la polimerasa el sector del material genético a ser replicado. Los partidores son diseñados para amplificar una secuencia específica y pueden analizarse bioinformáticamente para comprobar qué tan buena es la unión a ciertas secuencias según su complementariedad y calcular la temperatura media de unión, llamada temperatura de melting (Tm) para cada caso. Tm indica la temperatura a la cual la mitad de los nucleótidos complementarios se encuentran

unidos. La reacción de PCR comienza elevando la temperatura para que las hebras de DNA se separen, luego la temperatura es disminuida hasta una temperatura específica en que se unen los partidores, llamada temperatura de annealing. La temperatura vuelve a ser elevada levemente y con esto comienza la reacción de polimerización. Este ciclo es repetido numerosas veces, a fin de obtener múltiples copias del segmento deseado. En el caso del diagnóstico del virus IPN se utilizan partidores que permiten la amplificación de un sector del genoma del virus, los cuales pueden estar dirigidos tanto al segmento A, como al segmento B (Eissler *et al.* 2011, Ørpetveit *et al.* 2010, Rodriguez Saint-Jean *et al.* 2001, Williams *et al.* 1999)

### **1.3 Secuenciación y análisis bioinformático.**

En sus inicios las secuenciaciones de material genético se realizaban mediante el método Sanger, el cual consiste en utilizar dideoxinucléotidos, los cuales carecen del grupo –OH necesario para la inserción de un próximo nucleótido, por lo que al agregar éstos la elongación de la cadena nucleotídica se detiene. Para realizar esta secuenciación se utilizan cuatro reacciones, una con cada tipo de dideoxinucléotido (A, T, C y G), de modo que, por probabilidad, las secuencias quedan detenidas a distintas longitudes, para posterior a esto utilizar la electroforesis para ir descifrando la secuencia tratada. Con el paso de los años este método se perfeccionó, de modo que a los dideoxinucléotidos se les agregó un fluoróforo, la electroforesis pasó a realizarse en un capilar y la detección de la secuencia se realizaba mediante el uso de un computador (Nelson y Cox 2009). Actualmente una técnica de secuenciación muy accesible es mediante el uso de secuenciación de última generación, el cual es un proceso masivo que genera una alta cantidad y calidad de lecturas del material genético. Uno de los secuenciadores de última generación es el equipo ION torrent semiconductor, el cual es un chip que tiene incorporado un lector de pH altamente sensible y deduce la secuencia a partir de señales eléctricas que provienen de la liberación de un ión hidrógeno cada vez que un nucleótido es agregado a la secuencia. Esto elimina errores que anteriormente se daban debido a la baja confiabilidad de señales ópticas. La secuenciación se realiza utilizando la técnica de ‘shotgun’, la cual consiste en utilizar enzimas para cortar el material genético en

fragmentos de tamaños alrededor de los 400 pb y, con éstos, generar una biblioteca donde cada fragmento posee un adaptador que es reconocido por el chip. Luego comienza la polimerización de la cadena nucleotídica, donde cada nucleótido es agregado secuencialmente al medio de reacción y si es añadido a la cadena, entonces una señal eléctrica será recogida por el equipo. Si dentro de la secuencia un mismo nucleótido se presenta repetidas veces, la señal será más intensa, por lo que el equipo deducirá cuántos nucleótidos se han agregado. Junto con la deducción de cada nucleótido, el equipo reconoce la certeza de cada base y le asigna un puntaje de calidad.

Dado que los segmentos deben ser cortados en fragmentos de menor tamaño y a la alta cantidad de lecturas que se obtienen, las secuencias deben ensamblarse valiéndose de algoritmos diseñados para esta aplicación bioinformática. Para esto los programas consideran tanto las coincidencias entre las secuencias, como los puntajes de calidad asignados a cada fragmento ensamblado. Cuando las secuencias han sido ensambladas, éstas deben ser editadas manualmente para corregir errores que hayan permanecido en la muestra y que provienen tanto del proceso de secuenciación, como del ensamblaje.

Algunos patrones que pueden ser encontrados en las secuencias del virus, guardan relación con motivos de virulencia, es decir, el nivel de patogenicidad del virus puede estar encriptado en su secuencia genética. Como se mencionó anteriormente, la técnica del PCR puede o no requerir de un aislado viral previo y de esta diferencia en su aplicación se han hecho observaciones relacionadas a la virulencia del virus. Para esto, en los estudio de Santi *et al.* (2004) y Song *et al.* (2005) se han secuenciado muestras de virus de un mismo serotipo (Sp), que presentaban distintos niveles de virulencia, medidos según el porcentaje de mortalidad acumulada durante un período determinado. De estos estudios se ha concluido que, en términos generales, el residuo aminoacídico treonina en la posición 217 y alanina en la posición 221 han sido asociados a cepas virulentas. Para las cepas medianamente virulentas se han descrito los residuos prolina en la posición 217 y alanina en la posición 221 y las cepas avirulentas presentan treonina en la posición 221. También se ha observado que las cepas que generan mayor mortalidad tienen una mutación en el gen codificante de VP5, cuyas secuencias presentan codones de término prematuros, dando origen a una VP5 truncada, siendo la VP5 completa de 133 aminoácidos y las versiones truncadas de 128 y 105 aminoácidos. Esto podría

relacionarse a la idea de que VP5 tendría actividad antiapoptótica, más su presencia no es indispensable para la infección del virus (Santi *et al.* 2005). Estos motivos de virulencia descritos no han sido comprobados como una verdad universal del virus IPN, por lo que hace falta más investigación para aseverar cuáles serían los motivos de virulencia característicos de este virus.

A continuación se expondrán brevemente algunas aplicaciones bioinformáticas que serán de gran utilidad para este trabajo. Una de ellas es el algoritmo ClustalW, el cual es utilizado para realizar múltiples alineamientos entre secuencias. A grandes rasgos, el algoritmo comienza asignando puntajes a las secuencias y haciendo alineamientos entre dos secuencias, luego genera un árbol filogenético guía y va generando consecutivamente los alineamientos múltiples hasta completar el alineado general (Thompson *et al.* 1994). Otro algoritmo utilizado es el relacionado a la formación de árboles filogenéticos, en este trabajo el método de '*Neighbor-joining*' (unión de vecinos) (Saitou y Nei 1987). Éste método basado en el criterio de mínima evolución, busca a aquellos individuos que tengan una menor diferencia y los agrupa en torno a un mismo nodo. De esta forma identifica los nodos que tienen en común o con los que difieren todas las secuencias que son analizadas. Originalmente fue concebido con el uso del método de la distancia p (el cual sólo considera las diferencias entre nucleótidos o aminoácidos en una secuencia, pero obvia la posibilidad de que haya habido múltiples cambios en una misma posición). No obstante en este trabajo se utiliza, para la comparación de secuencias nucleotídicas, el método de Kimura 2 parámetros, pues este modelo considera la diferencia que hay en las tasas de mutaciones tanto de tipo transversional como transicional (mutaciones entre un mismo tipo de base nitrogenada púrica o pirimídica y mutaciones que cambian el tipo de base de púrica a pirimídica o vice versa, respectivamente). Esto debido a que las mutaciones de transición son más frecuentes que las de transversión y se les han asociado unidades de tiempo para estudios de filogenia. Por otra parte, para la comparación de secuencias aminoacídicas se utiliza la distribución estadística de Poisson, la cual sería la más indicada ya que ésta genera una corrección de las distancias, considerando la independencia de los eventos de sustitución con una gran cantidad de posibilidades, como lo son los aminoácidos (Tamura *et al.* 2013).

Otra aplicación bioinformática a ser revisada es el método de 'bootstrap', el cual toma los datos a analizar aleatoriamente y los prueba según el algoritmo elegido para esto. Esta tarea vuelve a realizarse tantas veces como el programador estime conveniente y luego el programa entrega un consenso con un puntaje asignado estadísticamente. Así la construcción de árboles filogenéticos utilizando el método Neighbor-joining en combinación de kimura 2 parámetros o corrección de Poisson, puede ser probado con bootstrap 1000, en el cual se realizarán 1000 iteraciones y el programa devolverá el árbol más confiable, asignando puntajes de 1 a 100 para cada rama del árbol.

La última aplicación bioinformática a ser analizada guarda relación con las diferencias de  $T_m$  y otras variables termodinámicas que pueden presentar los partidores cuando la secuencia blanco del partidore no es absolutamente complementaria a éste. Este cálculo es llamado 'Mismatch  $T_m$ '. Para esto se utilizan algoritmos que consideran la fuerza de la unión entre bases nitrogenadas complementarias, según el modelo propuesto por Watson y Crick, en el cual adenina es complementario a timina, formando dos puentes de hidrógeno (A=T) y citosina es complementaria a guanina, formando tres puentes de hidrógeno (C≡G). Sin embargo, también son posibles hibridaciones entre todas las otras combinaciones de bases nitrogenadas. La estabilidad del total de combinaciones posibles entre bases, en orden decreciente son  $G-C > A-T > G-G > G-T \geq G-A > T-T \geq A-A > T-C \geq A-C \geq C-C$ . Cabe destacar que el algoritmo realiza los cálculos a una determinada salinidad y temperatura, por lo que no se debe confundir el análisis que se deriva de estos datos con el análisis de  $T_m$  que se requiere para buscar la temperatura a la cual se alinean los partidores en un PCR en particular (SantaLucia y Hicks 2004). Para este cálculo se utiliza el programa en línea de Insilicase (<http://www.insilicase.co.uk/Web/Missmatch.aspx>), el cual entrega cálculos de:  $\Delta G$ , energía libre de Gibbs, el cual guarda relación con el equilibrio de una reacción y la espontaneidad con la que ocurre. Mientras más bajo sea su valor la reacción es más espontánea;  $\Delta H$ , entalpía, la cual indica si una reacción es endotérmica o exotérmica;  $\Delta S$ , entropía, el cual indica el desorden que hay en un sistema. Mientras menor sea su valor, más ordenado está el sistema.

#### **1.4 Planteamiento del problema.**

Dado que los virus de RNA tienen una alta tasa de mutaciones genéticas, se ha propuesto que cuando se trata de virus de RNA no se puede hablar de especie o cepa, sino que un grupo de virus se comporta como un enjambre mutante dinámico al que se ha denominado cuasiespecie (Domingo y Holland 1997). Conjuntamente, en el estudio de Romero-Brey *et al.* (2009) se hace mención a la posibilidad de que, en sectores geográficos en que se presenta más de un linaje viral, éstos pueden reordenarse, dando lugar a cepas que contienen cada segmento de material genético de distintas familias.

Esto se transforma en un problema para la industria del salmón, pues la complejidad para tratar con el virus IPN se hace mayor.

Además la técnica de detección RT-PCR tiene una gran limitación y ésta consiste en que los partidores son muchas veces generados para la detección de un genogrupo, generalmente debido a una alta prevalencia del genogrupo en cuestión en una zona geográfica, sin embargo nuestro país presenta variabilidad de genogrupo. Es por esto que se hace indispensable para una detección acuciosa del virus, revelar zonas conservadas del genoma viral que puedan servir de blanco para esta clase de técnica (Ørpetveit 2010).

En este trabajo se presenta el análisis de las secuencias completas de ambos segmentos del virus IPN, de muestras fueron enviadas al Laboratorio de Referencia para virus IPN, Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso desde distintos centros piscicultores del país. Estas muestras fueron previamente diagnosticadas en este laboratorio mediante qRT-PCR e IFAT. En este trabajo de tesis fueron secuenciadas aquellas muestras que pudieron ser aisladas mediante cultivo en línea celular CHSE-214. Con estas secuencias se pueden realizar los análisis bioinformáticos antes mencionados y aumentar la información respecto de las variantes del virus, presentes en las aguas chilenas.

## **2. Hipótesis y Objetivos.**

### **2.1 Hipótesis.**

La identificación de regiones conservadas en el genoma del virus IPN, mediante un análisis bioinformático de distintas variantes del virus, permite optimizar el diseño de partidores para su detección mediante la técnica de RT-PCR.

### **2.2 Objetivo general.**

Relacionar las diferencias entre las variantes genéticas del virus IPN para determinar su impacto en la detección del virus mediante RT-PCR.

### **2.3 Objetivos específicos.**

- Preparar las muestras de material genético viral para su secuenciación.
  
- Aplicar software bioinformáticos en el ensamble y análisis de las secuencias obtenidas de ambos segmentos virales.
  
- Procesar la información entregada por el secuenciador para definir el genoma de los segmentos completos, a partir de las secuencias de los diferentes aislados.
  
- Relacionar filogenéticamente los virus secuenciados, para ambos segmentos.
  
- Identificar residuos aminoacídicos relacionados con motivos de virulencia descritos en la literatura, en los segmentos secuenciados.
  
- Determinar la eficacia de los partidores utilizados en diagnóstico, mediante la comparación de diferencias en temperaturas de melting.

### **3. Materiales y Métodos.**

#### **3.1 Muestras.**

Las muestras de órganos (bazo y riñón) o peces completos (según corresponda) son enviadas, desde distintos centros piscicultores del país, al laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso, el cual es un laboratorio de referencia para virus IPN en el marco del proyecto “Identificación de Cepas y Nuevas Variantes de Virus IPN y Evaluación del Impacto de éstas en Atención a su Distribución Geográfica y Características de Cuadros Clínicos” (SUBPESCA, código 2013-32-DAC-17). Previamente en este laboratorio, el virus IPN es aislado mediante cultivo en línea celular CHSE-214 y se les realiza diagnóstico mediante IFAT (Espinoza y Kuznar 2002) y qRT-PCR dirigido a ambos segmentos (segmento A: Williams *et al.* 1999 y segmento B y protocolo para qRT-PCR: Eissler *et al.* 2011).

A continuación la tabla 3.1 muestra información de la procedencia de las muestras.

<b>Código</b>	<b>Tipo de centro</b>	<b>Especie</b>	<b>Estado</b>	<b>Ct PCR VP1</b>	<b>Ct PCR VP2</b>	<b>IFAT</b>
ABCD1	Lago	O. kisutch	Juvenil	22,43	25,28	Positivo
CGPC1	Mar	S. salar	Engorda	19,05	23,08	Positivo
CGPC5	Mar	S. salar	Engorda	18,91	23,30	Positivo
CNJJ2	N/I	N/I	N/I	N/I	N/I	N/I
EBPS1	Mar	S. salar	Engorda	28,36	26,62	Positivo
EBPS2	Mar	S. salar	Engorda	29,23	28,42	Positivo
IPNV3	Lago	S. salar	Smolt	20,20	23,90	Positivo
IPNV11	Río	O. kisutch	Alevín	26,46	28,01	Positivo
LKJH6	Lago	O. kisutch	Juvenil	30,92	31,96	Positivo
MPMA1	Mar	S. salar	Engorda	22,74	23,28	Positivo
PITR1C	Río	O. mykiss	Alevín	23,52	26,05	Positivo
RV04	N/I	N/I	N/I	N/I	N/I	N/I

Tabla 3.1: Información de las muestras utilizadas en este estudio. Los códigos asociados a cada muestra son otorgados en los centros piscicultores. N/I es No informado.

### 3.2 Extracción de RNA.

La extracción se realizó con el kit de extracción “E.Z.N.A. Total RNA kit I” (Omega Biotek).

Se extrajeron 800  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cultivo viral (segundo o tercer pase por cultivo en línea celular CHSE-214), los cuales corresponden a cuatro pasadas por la columna de extracción que proporciona el kit. Además, junto a cada set de muestras a extraer, se realizó un control de extracción, utilizando 200  $\mu\text{L}$  de agua calidad PCR libre de nucleasas marca ‘Hyclone’, en vez de sobrenadante, para comprobar que los reactivos no estén contaminados y que el proceso fuese llevado a cabo adecuadamente. Previamente debió prepararse el ‘TRK Lysis Buffer’, agregando 20  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada mL del reactivo.

Se agregaron al sobrenadante 1200  $\mu\text{L}$  de ‘TRK Lysis Buffer’ y se mezcló con el uso de vortex ‘MX-S’ (SCIOLOGEX) durante 30 segundos. Luego se agregan 1200  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se volvió a agitar con vortex por otros 30 segundos. La mezcla resultante se agregó a la columna y se centrifugó a 15000 g por 1,5 minutos en centrífuga ‘MIKRO 22R’

(Hettich zentrifugen), este paso se realizó consecutivamente 4 veces para pasar todo el contenido por la columna. A continuación se realizó un lavado con 500  $\mu\text{L}$  de ‘RNA Wash Buffer I’, seguido por centrifugación durante 1,5 minutos a 15000 g, otro lavado con 500

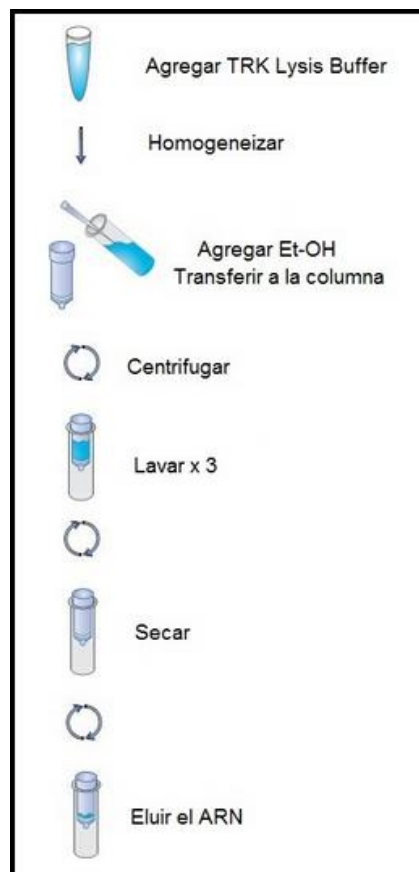


Figura 3.1: Esquema del protocolo de extracción de RNA. (<http://omegabiotek.com/store/product/total-rna-kit-i/>)

$\mu\text{L}$  de 'RNA Wash Buffer II' seguido por centrifugación en idénticas condiciones que la anterior y un último lavado con 350  $\mu\text{L}$  de 'RNA Wash Buffer II', seguido de la última centrifugación con los parámetros antes mencionados. Luego la columna fue centrifugada vacía durante 2,5 minutos a 20000 g a fin de secar los restos de etanol. Para finalizar se agregaron 40  $\mu\text{L}$  de agua 'Hyclone' tibia, se dejó incubar por 5 minutos, tras lo cual, se centrifugó a 20000 g por 3 minutos. Una vez terminado este proceso se separaron 6  $\mu\text{L}$  para medir la concentración final del RNA extraído y el resto de la muestra (34  $\mu\text{L}$ ) fueron almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **3.3 Medición de concentración de RNA.**

La medición de concentración se realizó con el equipo "MaestroNano" (Maestrogen). Para comenzar se estableció un blanco de medición con el agua calidad PCR libre de nucleasas. Una vez realizado el blanco, 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra de RNA extraído de los aislados virales (en adelante las 'muestras') fueron medidos en triplicado. El equipo entrega mediciones de absorvancia a 230 nm, 260 nm y 280 nm, las razones 260/230 y 260/280 y la concentración de RNA en ng/  $\mu\text{L}$ .

### **3.4 Curva de calibrado de temperatura de annealing para partidores A-A5EJ'NC\* y A-IPNVEJR\* para amplificación del Segmento A completo.**

Los partidores A-A5EJ'NC\* y A-IPNVEJR\* fueron diseñados previamente en el laboratorio.

Para encontrar la temperatura a la cual los partidores se acoplan más eficientemente a los templados, se realizó una curva de calibrado utilizando el aislado viral denominado UV2014, el cual actúa como control y corresponde al virus aislado y caracterizado por Espinoza *et al.* 1985. El perfil de temperatura consiste en realizar un RT-PCR (protocolo descrito a continuación) ajustando el termociclador para que genere una gradiente de

temperatura de 45°C a 60°C en la placa. De esta forma, la curva de calibrado de seis puntos se realizó a 50,6°C, 52,4°C, 55,3°C, 57,3°C, 58,9°C y 59,4°C.

### 3.5 RT-PCR de segmentos A y B completos

El protocolo de RT-PCR utilizado en el desarrollo de esta tesis, realiza en un solo paso, la etapa de retrotranscripción y PCR. La enzima RT utilizada es 'RT/RNase Block' (Agilent Technologies), la cual es agregada en conjunto con el MasterMix de la enzima "DreamTaq DNA Polymerase" (ThermoScientific) junto a todos los otros reactivos del PCR (Detalles de volúmenes utilizados por cada reacción en Tabla 3.3). Posteriormente, las muestras son puestas en el equipo termociclador "Multigene" (Labnet International), aplicando el programa que consta en dos pasos: el primero de ellos, la retrotranscripción y el segundo es el PCR propiamente tal. Junto con cada conjunto de muestras de RNA, provenientes de los aislados virales, se incluyó un control positivo con la muestra UV2014. A continuación las tablas 3.2 y 3.4 muestran detalles sobre los partidores utilizados para la amplificación de ambos segmentos virales completos y el programa utilizado y sus etapas.

	Primers 5' -> 3'	Tm (°C)	%GC
Segmento A	A-A5EJ-NC*		
	GGAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTA	56,6	40,7
	A-IPNVEJ-R*		
	ATCAGTCAGGAAAGAGAGTAGTCGTTA	56,6	40,7
Segmento B	B-B5EJ F		
	GGAAACAGTGGGTCAACG	53,7	55,5
	B-IPNVEJ R		
	TTTTTCAGGGGTCATGTTGG	52,8	47,3

Tabla 3.2: Partidores utilizados para amplificación de segmentos virales completos. Estos partidores fueron previamente diseñados en el laboratorio.

Item	Volumen [uL]
Agua Hyclone	8,2
Primer forward	1,5
Primer reverse	1,5
DremTaq green master mix	15,0
RT/Rnase Block	0,8
Templado RNA	3,0
Volumen final	30,0

Tabla 3.3: Volúmenes de reactivos utilizados para reacción de RT-PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Retrotranscripción	50	30	
Denaturación primaria	95	3	
Denaturación	95	0,5	35
Annealing	57,6	0,5	
Extensión	72	5	
Extensión final	72	10	

Tabla 3.4: Detalles de programa de amplificación.

### **3.6 Electroforesis.**

Para realizar la electroforesis se preparó un gel de agarosa al 1% m/v en buffer SB (2,25 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,4 g NaOH por cada litro de buffer, el pH se ajusta a 8,0) y se cargaron 5 µL de producto de PCR con 1 µL de 'Buffer de carga azul 6x' (Winkler). También, en la primera columna, se agregaron 2 µL del marcador de tamaño molecular '1 Kb DNA ladder' (Biolabs) con 1 µL del mismo Buffer de carga.

La electroforesis se corrió en una cámara electroforética "MiniSub" (Biorad) a 100 V durante 70 minutos.

Para revelar el gel, éste primero debió teñirse en una solución de 50 mL de agua destilada y 15 µL de 'GelRednucleicacid gel stain' (Biotium) durante una a tres horas en reposo. Una vez concluido este tiempo, se expuso a luz UV y se guardó un registro digital con el equipo "Enduro GDS" (Labnet international, inc). El criterio para considerar que el segmento requerido se ha amplificado correctamente, es la visualización de la banda frente al marcador de tamaño de 3000 pb.

### **3.7 Purificación de cDNA**

Para purificar el producto de PCR de aquellas muestras que hayan presentado una banda satisfactoria en la electroforesis, se utilizó el kit "E.Z.N.A. CyclePure" (Omega Biotek). Para purificar los 25 µL de reacción de PCR, se agregaron 100 µL de Tampón CP y mezclaron, por medio de vortex, durante uno a dos minutos. Luego toda la mezcla fue transferida a una columna proporcionada por el kit y se centrifugó a 13000 g por un minuto. El líquido del tubo colector se descartó y luego siguieron dos lavados de 700 µL y 500 µL de DNA Wash Buffer, intercalados por una centrifugación a 13000 g por un minuto. Luego la columna se centrifugó vacía por dos minutos a 15000 g para secarla. Para finalizar, se agregaron 40 µL de Agua Hyclone tibia y se dejó incubando a temperatura ambiente por dos minutos. Luego se centrifugó por un minuto a 15000 g.

Al finalizar se midió la concentración de cDNA presente en la muestra siguiendo el mismo protocolo utilizado para medir la concentración de RNA, para esto fueron separados 6 uL del producto de PCR purificado y el resto se almacenó a -80°C para su uso posterior.

### **3.8 Secuenciación.**

Para la secuenciación, las muestras de cDNA fueron enviadas a OMICS Solutions, donde se realizó una secuenciación utilizando la técnica de shotgun y un secuenciador ION Torrent PGM (Personal Genome Machine) con chip 314.

OMICS Solutions pide alrededor de 1000 ng totales de cDNA para realizar la secuenciación, por lo que pueden enviarse alrededor de 500 ng por cada segmento.

### 3.9 Ensamblaje de secuencias.

El ensamblaje de las secuencias se realizó utilizando el programa CodonCodeAligner (CodonCodeCorporation), el cual puede ensamblar secuencias *de novo* o en base a una secuencia de referencia. Para esto, todas las lecturas de la secuenciación correspondientes a una muestra enviadas por OMICS Solutions, fueron puestas en un nuevo proyecto. Antes de comenzar a ensamblar se quitó toda aquella información que fue considerada como poco relevante, por lo que todas las lecturas que presentaban una longitud menor o igual a 100 nucleótidos fueron eliminadas; también aquellas lecturas cuya calidad obtuvo un puntaje inferior a 60. El programa ensambla aquellas secuencias que tengan por lo menos 80% de identidad y un largo no inferior a los 30 nucleótidos, de ésta forma la combinación de estas dos condiciones aseguraron un buen ensamble de las secuencias.

Para ensamblar las secuencias, se utilizaron 4 tipos de ensayos:

En el primer ensayo se tomaron todas las lecturas y fueron ensambladas.

En el segundo ensayo las lecturas fueron ordenadas según su nombre para asegurar una distribución aleatoria y fueron tomadas por intervalos uniformes según la cantidad de lecturas. Por ejemplo, si se estaba trabajando con alrededor de 40000 lecturas, se hicieron 8 ensamblajes considerando alrededor de 5000 lecturas. Cada nuevo ensamblaje no consideró a aquellas lecturas que no se ensamblaron en la pasada anterior.

En el tercer ensayo fueron utilizadas todas aquellas lecturas cuya longitud fue mayor o igual a 250 nucleótidos.

Las secuencias que se han ensamblado son llamadas 'contigs' y de cada ensayo fueron tomados todos aquellos que, por su longitud, se creyó que correspondían a los segmentos deseados del virus y fueron comparados con las secuencias de West Buxton (AF078668.1 y AF078669.1; números de acceso a GenBank de Segmento A y B respectivamente) a fin de discriminar primariamente entre segmento A, B o si se trató de algún ensamblaje sin sentido.

En el cuarto ensayo todos los segmentos A fueron ensamblados entre ellos y lo mismo se hizo para los segmentos B. De esta forma se obtuvieron alrededor de 8 contigs de cada segmento del virus por muestra. Todas estas secuencias fueron exportadas a una nueva carpeta de trabajo que lleva el nombre de la muestra.

### **3.10 Edición de secuencias.**

Para mejorar las secuencias entregadas por el programa Codon Code Aligner, se utilizó el programa MEGA6 (Tamura *et al.* 2013), con el cual se alinearon todas las secuencias obtenidas anteriormente y se ajustaron según las secuencias de referencias (los números de acceso de las secuencias de referencia utilizadas para la comparación de los segmentos, se encuentran en el anexo 8.1). Dado que algunas secuencias provenían de la lectura de la hebra no codificante, éstas debieron revertirse con el uso del programa antes de comenzar a alinear las secuencias. Una vez que todas las secuencias se encontraron en la posición correcta, se procedió a generar el alineamiento con el algoritmo ClustalW, de esta forma se hicieron visibles todas aquellas áreas que debieron ser editadas manualmente.

Para asegurar una edición no arbitraria, al comienzo las secuencias fueron editadas sin utilizar comparación con las secuencias de referencia, por lo que sólo se contrastaba entre los contigs generados en los distintos ensayos. Posteriormente y para asegurar que las secuencias tuvieran sentido en la traducción, éstas se alinearon también con el marco de lectura de las secuencias de referencia, por lo que continuamente se contrastó tanto con la secuencia nucleotídica, como con la aminoacídica.

### **3.11 Construcción de árboles filogenéticos.**

Para la construcción del árbol filogenético se utilizó la herramienta de filogenia del programa MEGA6. Para esto se generaron dos archivos, uno para el segmento A y otro para el segmento B, con todas las secuencias a las cuales se les quitó toda la parte no codificante y alinearon con el algoritmo ClustalW. Luego se construyó el árbol filogenético utilizando una prueba de filogenia, en este caso Bootstrap con mil réplicas de alineamientos y se utilizó el método de Neighbor joining (unión de vecinos).

Como modelo para la filogenia en base a la secuencia nucleotídica se utilizó el método de Kimura con 2 parámetros y como modelo para las secuencias aminoacídicas se utilizó la distribución de Poisson. Junto con este análisis se hará la búsqueda de aminoácidos relacionados con motivos de virulencia descritos en la bibliografía.

### **3.12 Comparación de temperaturas de mismatch de partidores utilizados para diagnóstico.**

Para realizar el cálculo de la Tm de mismatch, se generó un alineamiento con el programa MEGA6 de los segmentos A de las muestras secuenciadas. Luego fueron alineados los pares de partidores y las Tm de las diferentes secuencias se calcularon con el programa en línea disponible en <http://www.insilicase.co.uk/Web/Missmatch.aspx>. Para calcular el partidador reverso se revirtieron las secuencias y no el partidador.

#### **4. Resultados.**

##### **4.1 Extracción de RNA y medición de su concentración.**

Las mediciones de las concentraciones de RNA fueron las siguientes:

<b>Muestra</b>	<b>RNA total ng/uL</b>
ABCD 1	23,39
CGPC 1	13,47
CGPC 5	11,42
CNJJ 2	32,97
EBPS 1	13,57
EBPS 2	15,79
MPMA 1	12,75
IPNV 3	11,56
IPNV 11	20,5
LKJH 6	17,82
PITR 1C	26,98
RV 04	36,24

Tabla 4.1: Concentración de RNA total extraído.

#### **4.2 Curva de calibrado de temperatura de annealing para partidores A-A5EJ'NC\* y A-IPNVEJR\* para amplificación del Segmento A completo.**

Al hacer la curva de calibrado con la muestra UV2014, no se pudieron observar mayores diferencias entre las distintas temperaturas probadas, por lo que se decidió trabajar con temperatura de annealing de 57,6°C, debido a que es la misma temperatura a la cual se alinean los partidores para amplificación de segmento B, previamente estandarizados en este laboratorio. La figura 4.1 muestra la curva de calibrado, hecha con el protocolo regular de RT-PCR.

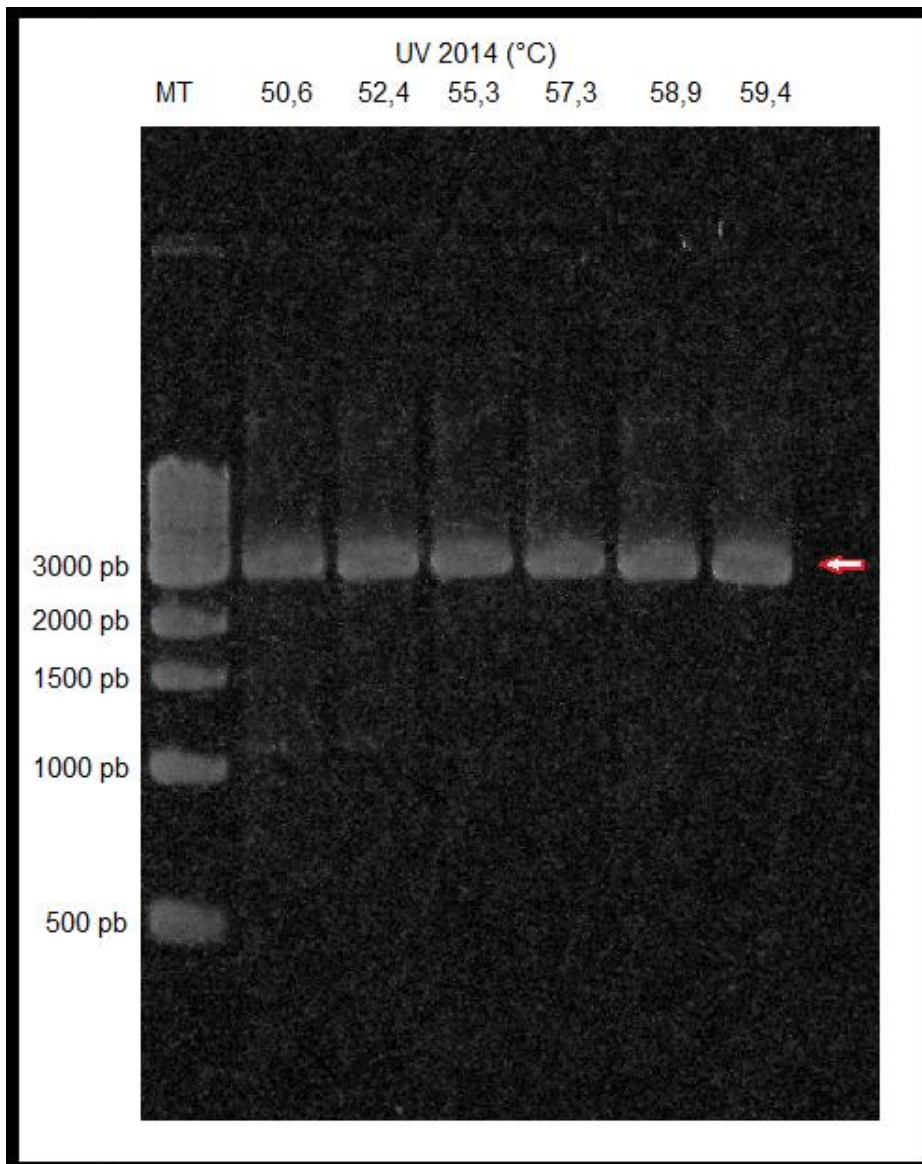


Figura 4.1: Curva de calibrado para partidores A-A5EJ'NC\* y A-IPNVEJR\*. La flecha roja indica el producto esperado. 'MT' es el marcador de tamaño.

### **4.3 RT-PCR de segmentos A y B completos y electroforesis.**

A pesar de que se intentó amplificar un gran número de muestras, no todos los segmentos pudieron ser amplificados correctamente. Las electroforesis fueron llevadas a cabo sin complicaciones. A continuación las imágenes 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5 exhiben las fotografías de aquellas muestras en que se pudo amplificar tanto el segmento A como el segmento B correctamente y que, finalmente, fueron las que se enviaron a secuenciar a OMICS Solutions. Como puede observarse, en el segmento B se presenta una banda secundaria entre los 500 y 1000 pb, también en las muestras LKJH6 y PITR1C pueden observarse múltiples bandas en el segmento B. Sin embargo, estas bandas secundarias no afectaron mayormente los resultados de la secuenciación.

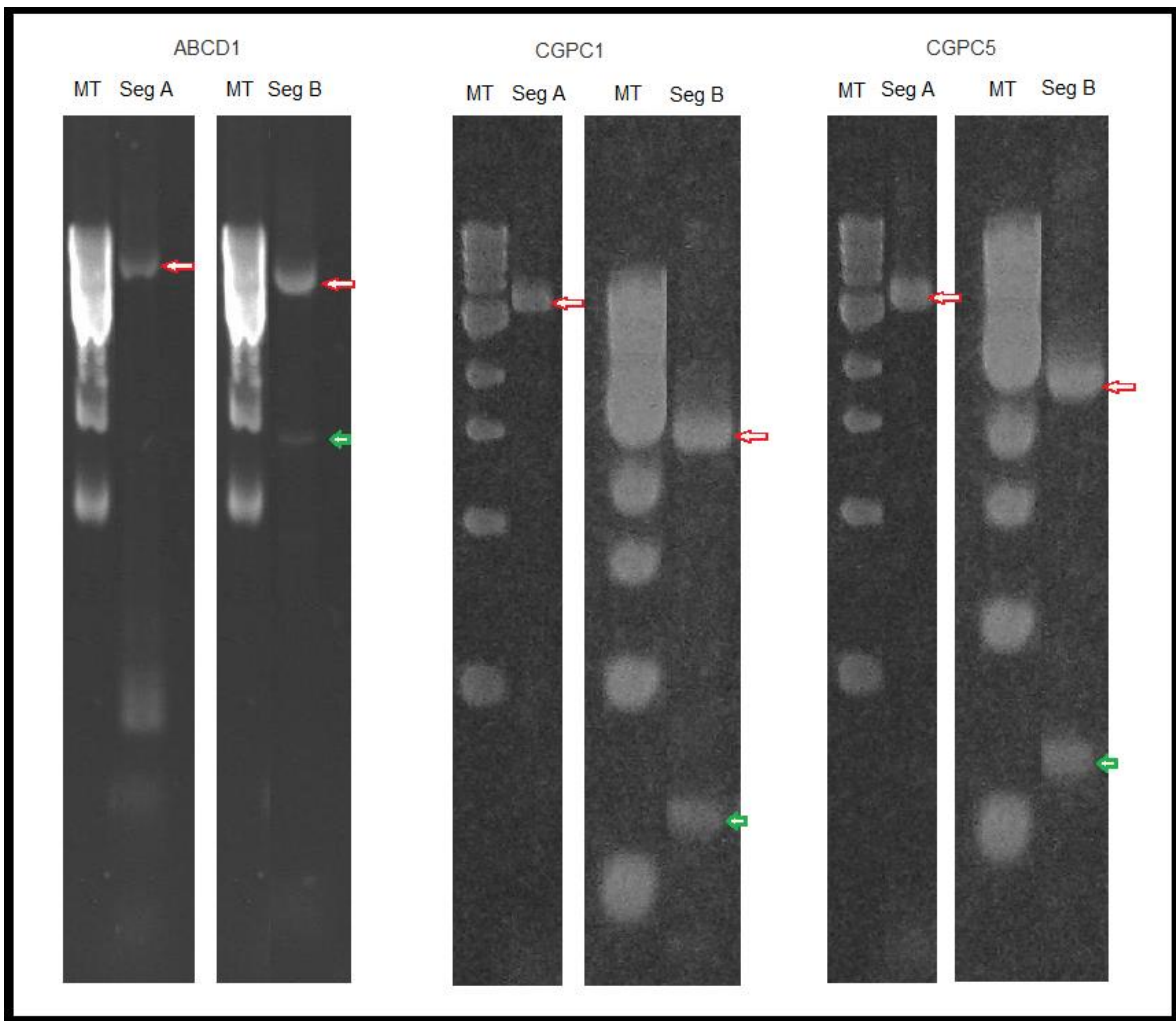


Figura 4.2: Electroforesis de muestras ABCD1, CGPC1 y CGPC5. 'MT' es el marcador de tamaño; 'Seg A' y 'Seg B' son los segmentos A y B, respectivamente. Las flechas rojas indican el segmento esperado, alrededor de los 3000 pb. También, en esta primera serie de imágenes, las flechas verdes indican el producto secundario antes mencionado.

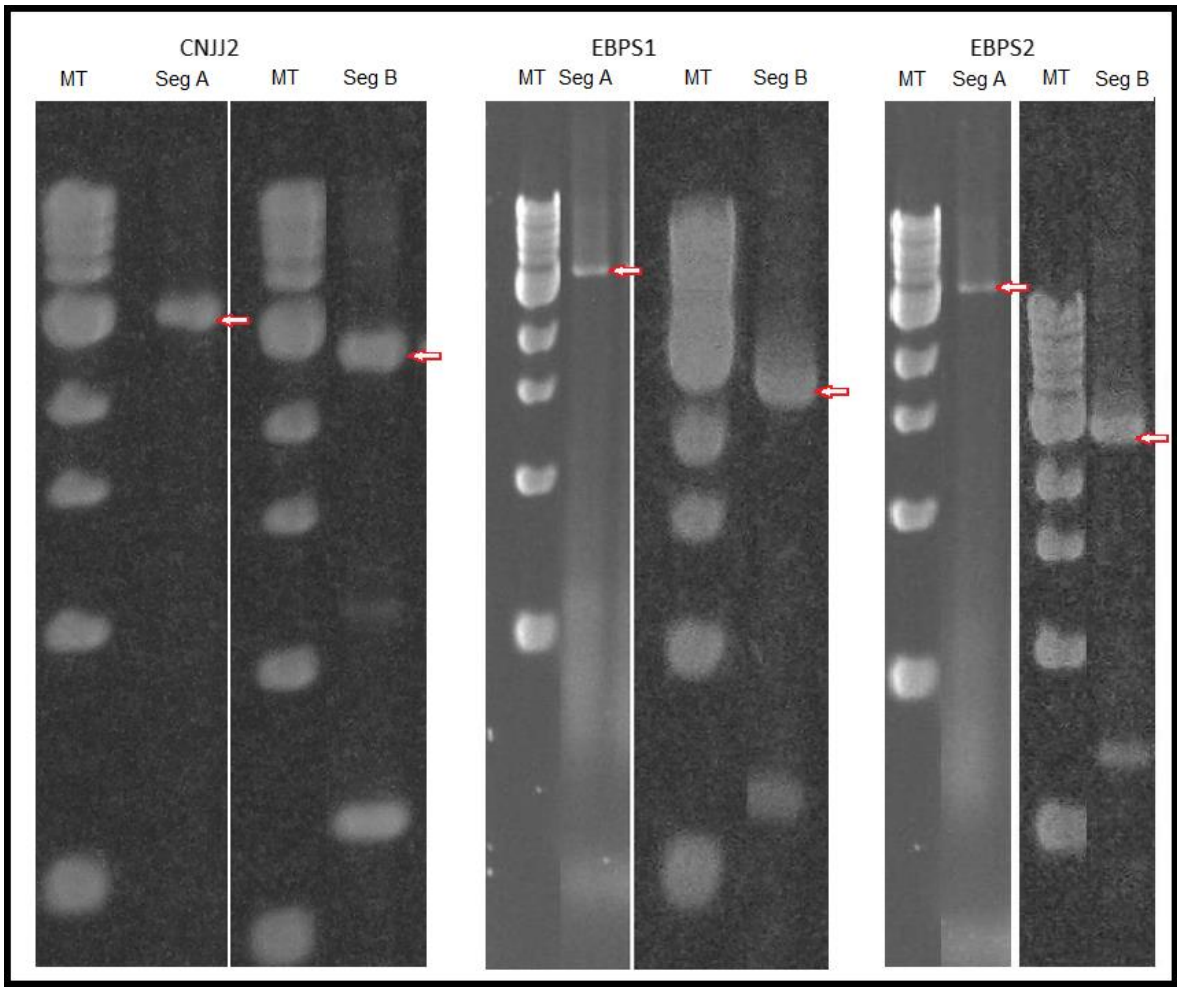


Figura 4.3: Electroforesis de muestras CNJJ2, EBPS1 y EBPS2. 'MT' es el marcador de tamaño; las flechas rojas indican el segmento esperado.

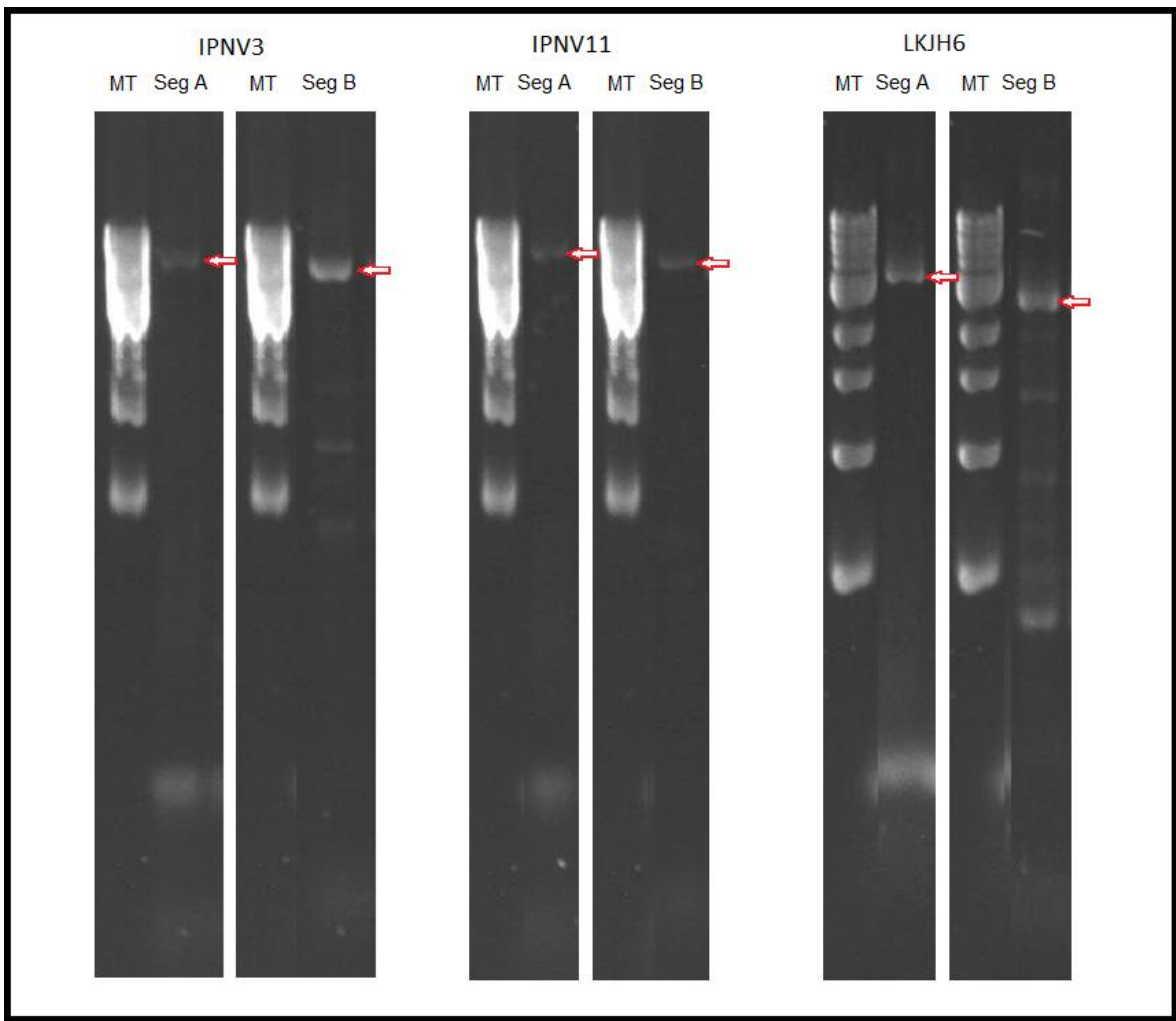


Figura 4.4: Electroforesis de muestras IPNV3, IPNV11 y LKJH6. 'MT' es el marcador de tamaño; las flechas rojas indican el segmento esperado.

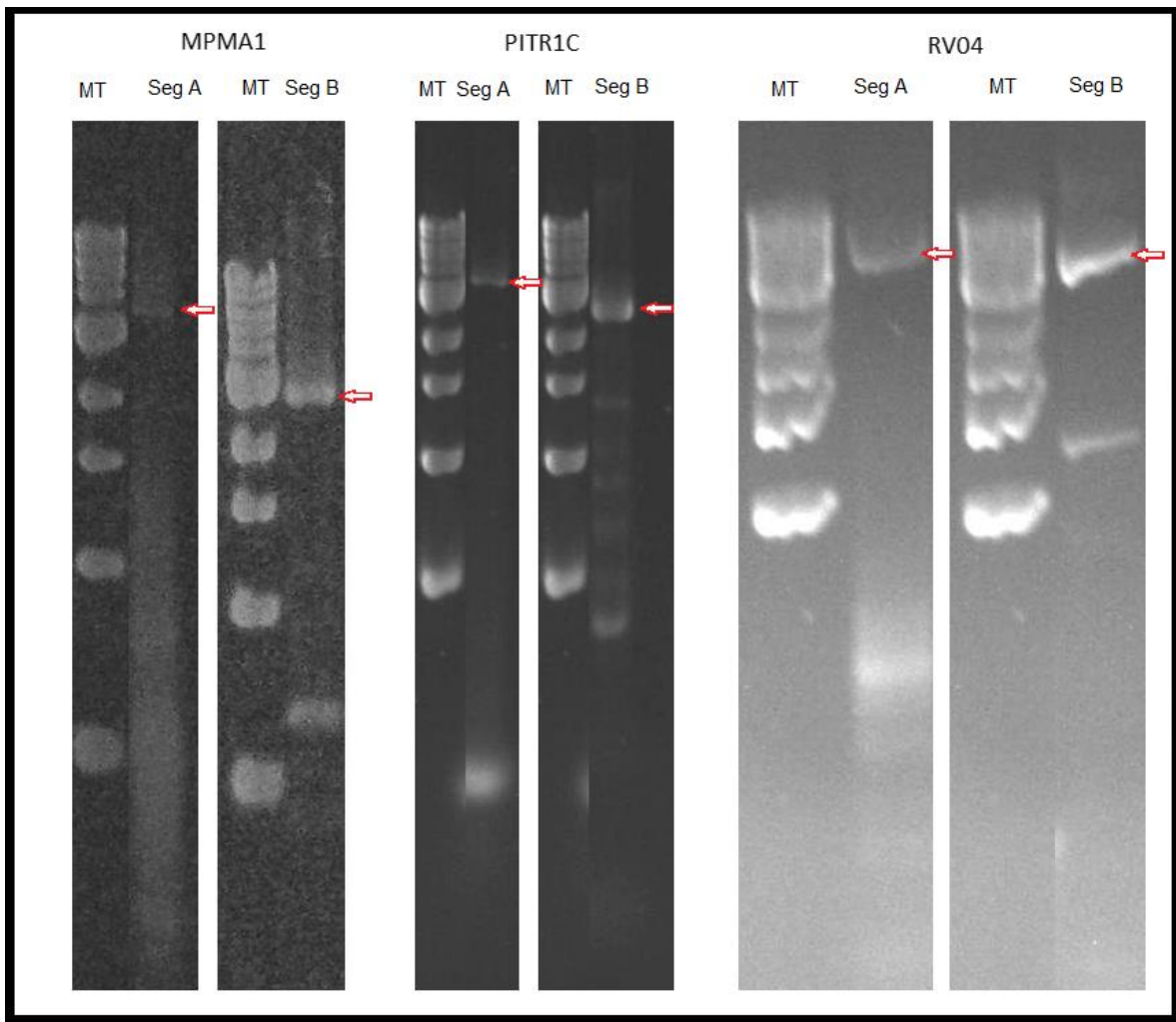


Figura 4.5: Electroforesis de muestras MPMA1, PITR1C y RV04. 'MT' es el marcador de tamaño; las flechas rojas indican el segmento esperado.

#### 4.4 Purificación de cDNA y medición de su concentración.

A continuación la tabla 4.2 presenta la concentración de cDNA, medida con el equipo Maestronano, de las muestras que fueron enviadas a OMICS Solutions para su secuenciación.

<b>Muestra</b>	<b>Mediciones de concentración ng/uL</b>
ABCD 1A	17,0
ABCD 1B	23,6
CGPC 1A	20,0
CGPC 1B	19,1
CGPC 5A	25,7
CGPC 5B	20,1
CNJJ 2A	22,2
CNJJ 2B	37,0
EBPS 1A	24,1
EBPS 1B	20,7
EBPS 2A	18,1
EBPS 2B	22,6
IPNV 3A	9,9
IPNV 3B	15,2
IPNV 11A	17,7
IPNV 11B	11,2
LKJH 6A	17,2
LKJH 6B	15,0
MPMA 1A	35,1
MPMA 1B	20,9
PITR 1C A	11,3
PITR 1C B	15,7
RV 04A	18,6
RV 04B	18,5

Tabla 4.2: Concentración de cDNA.

#### 4.5 Secuenciación.

Aparte de las lecturas de las secuencias, OMICS Solutions envía un informe acerca de la calidad de la secuenciación. Todas las muestras presentaron la mayor cantidad de lecturas de fragmentos de alrededor de 250 pb.

La cantidad de lecturas por muestras resultó ser muy variable, promediando en 42503 lecturas.

<b>Muestra</b>	<b>Datos crudos</b>
ABCD 1	29971
CGPC 1	22200
CGPC 5	30177
CNJJ 2	28961
EBPS 1	15691
EBPS 2	17309
IPNV 3	14417
IPNV 11	98302
LKJH 6	109426
MPMA 1	108920
PITR 1C	20545
RV 04	14125

Tabla 4.3: Resultados de la secuenciación. La columna 'Datos crudos' indica la cantidad de lecturas entregadas por el equipo ION Torrent.

#### 4.6 Ensamblaje de secuencias.

Los 'contigs' esperados entregados por el programa resultaron mayores al tamaño deseado, llegando a superar, incluso, los 4600 nucleótidos en una muestra. La mayoría de los 'contigs' resultaron de alrededor de 3500 nucleótidos, sin embargo esto no generó complicaciones al momento de la edición, ya que posteriormente se evidenció que la mayor parte sobrante se encontraba agrupada en los extremos y no al interior de las secuencias.

En el anexo 8.2 se presenta una tabla que contiene los parámetros con que se realizó el ensamblaje de cada una de las secuencias.

#### 4.7 Edición de secuencias.

La siguiente tabla presenta un resumen de las secuencias resultantes para cada muestra.

Muestra	Largo [pb]		% Amplificado	
	Segmento A	Segmento B	Segmento A	Segmento B
ABCD 1	3058	2757	98,7	99,0
CGPC 1	3060	2751	98,8	98,8
CGPC 5	3058	2754	98,7	98,9
CNJJ 2	3058	2753	98,7	98,9
EBPS 1	3060	2753	98,8	98,9
EBPS 2	3060	2748	98,8	98,7
IPNV 3	3058	2753	98,7	98,9
IPNV 11	3058	2754	98,7	98,9
LKJH 6	3059	2764	98,7	99,3
MPMA 1	3061	2758	98,8	99,1
PITR 1C	3060	2757	98,8	99,0
RV 04	3058	2754	98,7	98,9

Tabla 4.4: Largo de las secuencias resultantes. El porcentaje amplificado para cada segmento se calcula en comparación con el trabajo realizado por Yao y Vakharia (1998).

En el anexo 8.3 se presentan las secuencias resultantes para cada muestra.

#### **4.8 Árboles filogenéticos.**

Al realizar los árboles filogenéticos se comprobó que las muestras que se tenían pertenecían a los genogrupos 1 y 5, resultado obtenido previamente en este laboratorio por medio de la secuenciación parcial de las secuencias, por 1180 pb (no mostrado).

A continuación las imágenes 4.6 y 4.7 corresponden a los árboles filogenéticos realizados con las secuencias nucleotídicas de los segmentos A y B del virus IPN. Éstos fueron realizados tomando algunas secuencias de referencia representativas para cada grupo y en el caso del árbol construido en base al segmento B, sólo se han conservado aquellas secuencias de referencia de los genogrupos 1 y 5.

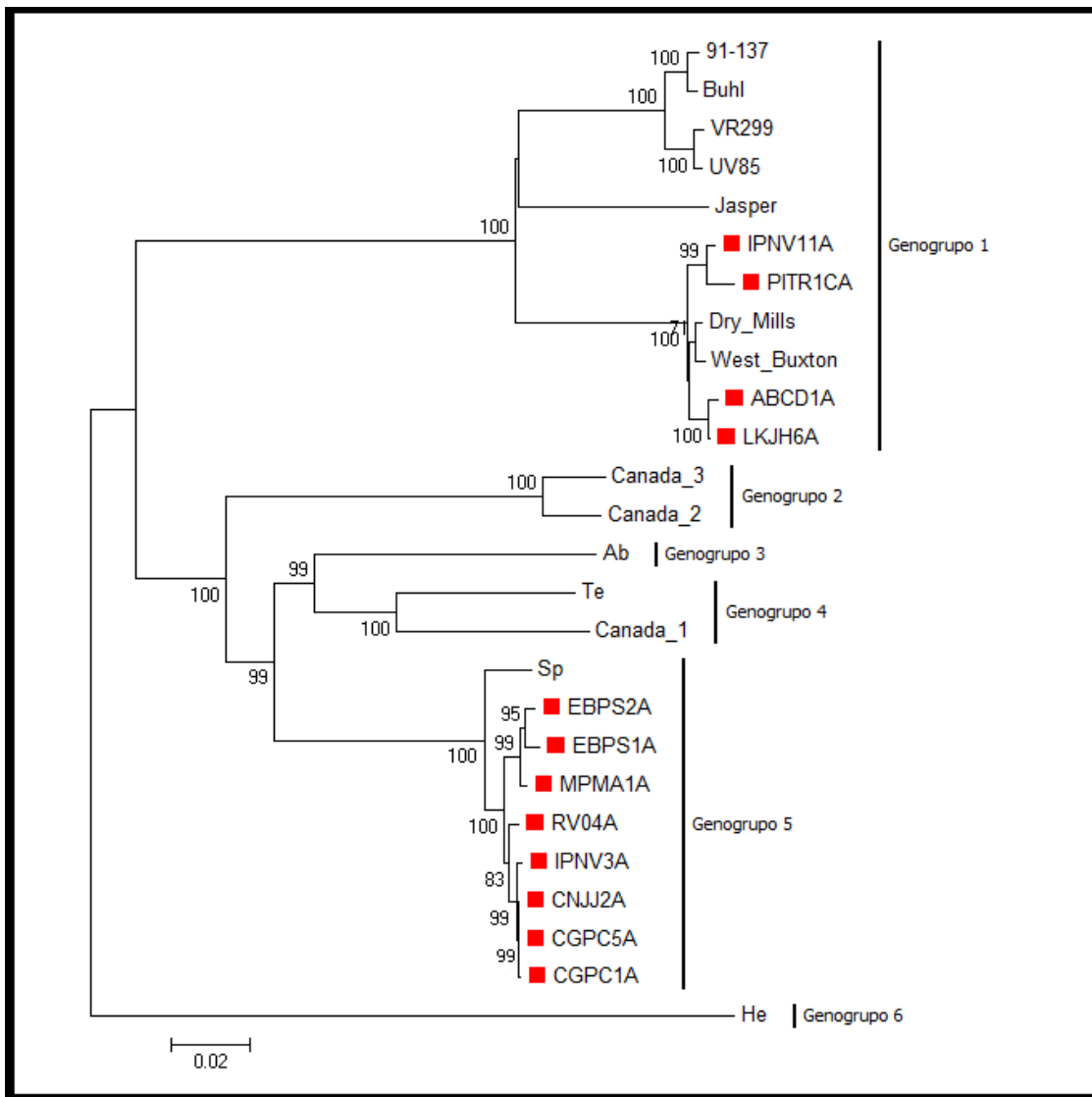


Figura 4.6: Árbol filogenético construido con la porción codificante del ORF mayor del Segmento A. Los cuadrados rojos indican las muestras secuenciadas en este estudio.

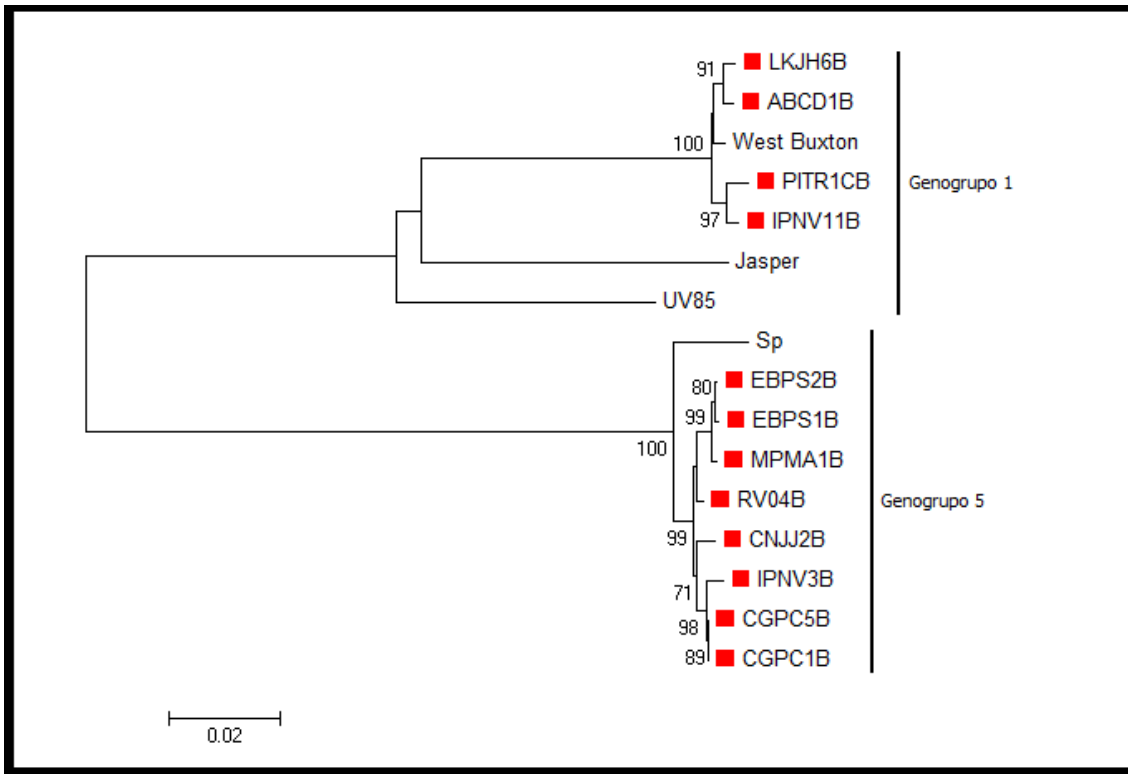


Figura 4.7: Árbol filogenético construido con la porción codificante del segmento B. Los cuadrados rojos indican las muestras secuenciadas en este estudio.

También se construyeron árboles filogenéticos utilizando las secuencias aminoacídicas para ambos segmentos. Para el segmento A fue considerada la secuencia de la poliproteína.

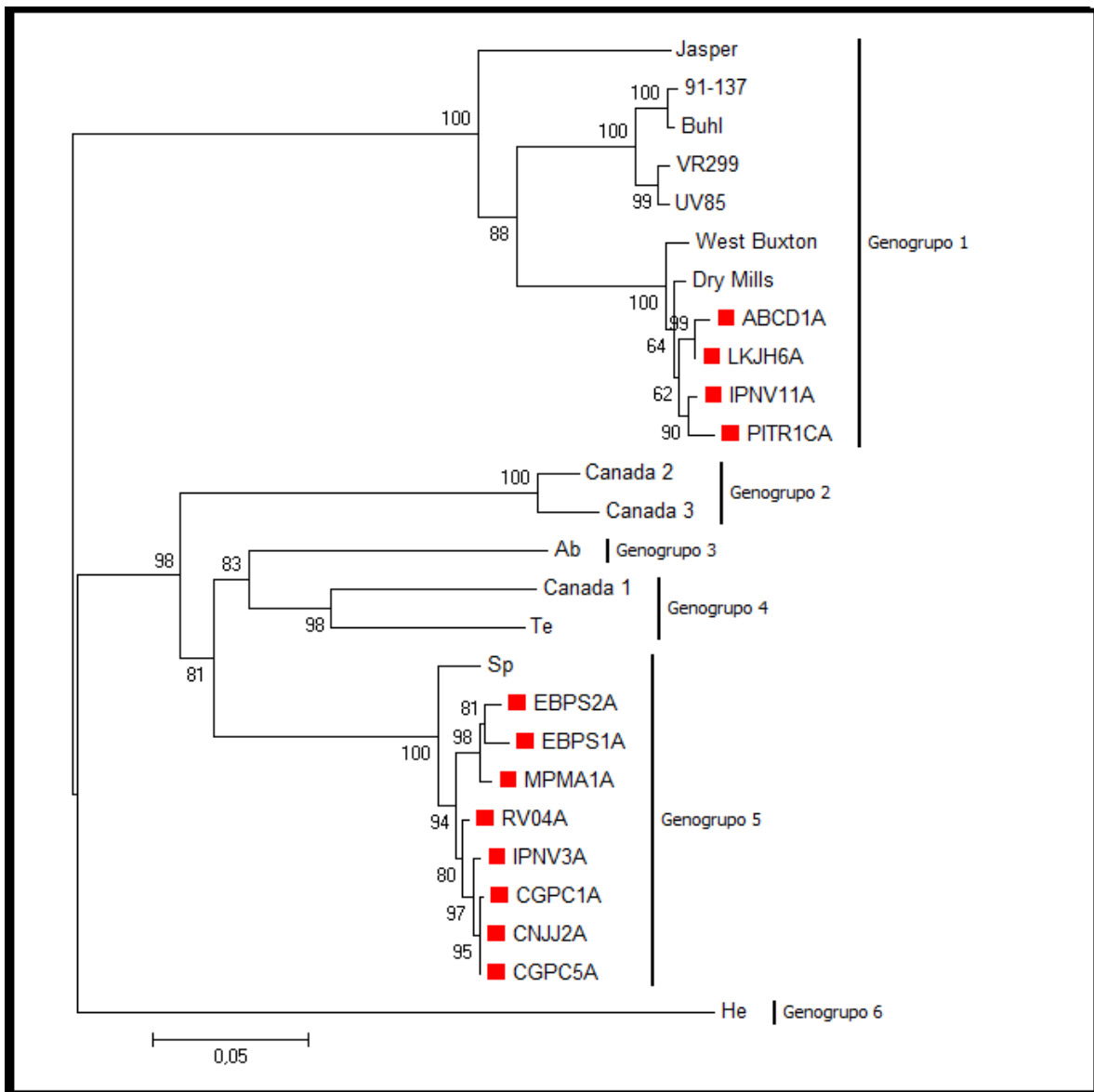


Figura 4.8: Árbol filogenético construido con las secuencias aminoacídicas de la poliproteína del segmento A. Los cuadrados rojos indican las muestras secuenciadas en este estudio.

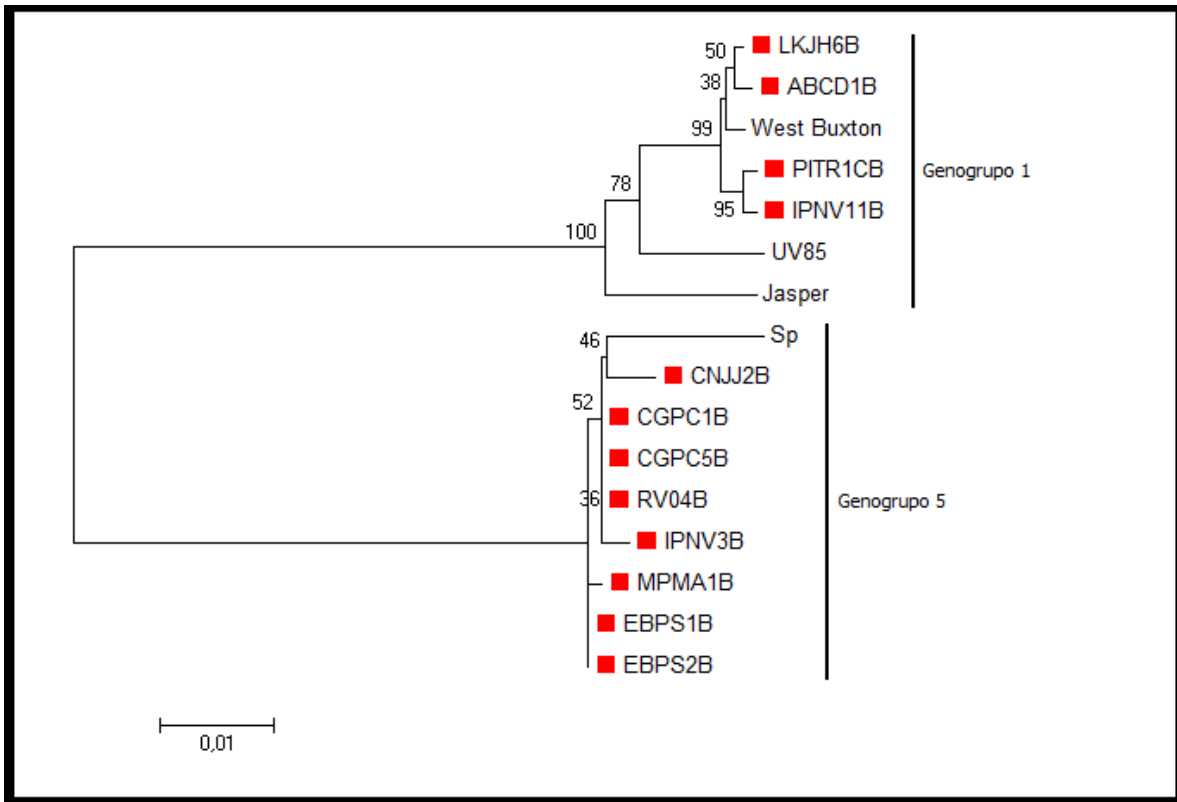


Figura 4.9: Árbol filogenético construido con las secuencias aminoacídicas del segmento B. Los cuadrados rojos indican las muestras secuenciadas en este estudio.

#### 4.8.1 Motivos de virulencia.

Al analizar los residuos aminoacídicos relacionados con motivos de virulencia presentados en la literatura tanto por Santi *et al.* (2004) y Song *et al.* (2005) para serotipo Sp (genogrupo 5), se evidencia que éstos se presentan en algunas muestras pertenecientes al genogrupo 5, más no en representantes del genogrupo 1.

	<b>Muestra</b>	<b>Residuo 217</b>	<b>Residuo 221</b>	<b>mortalidad %</b>
Genogrupo 1	ABCD 1	Ala	Thr	1,1
	IPNV 11	Ala	Thr	0,02
	LKJH 6	Ala	Thr	0,76
	PITR 1C	Ala	Thr	0,19
Genogrupo 5	CGPC 1	<b>Thr</b>	<b>Ala</b>	0,83
	CGPC 5	<b>Thr</b>	<b>Ala</b>	0,83
	CNJJ 2	<b>Thr</b>	<b>Ala</b>	No informada
	EBPS 1	Ala	Thr	0,14
	EBPS 2	Ala	Thr	0,14
	IPNV 3	Thr	Thr	0,07
	MPMA 1	<b>Thr</b>	<b>Ala</b>	8,5
RV 04	Thr	Thr	No informada	

Tabla 4.5: Residuos aminoacídicos relacionados con motivos de virulencia presentes en las muestras y mortalidad asociada a cada brote de IPN. En negrita se destaca el motivo de virulencia descrito en la literatura.

#### 4.9 Comparación de temperaturas de mismatch de partidores utilizados para diagnóstico.

En general se observa una clara tendencia de especificidad hacia un genogrupo de los pares de partidores que se probaron.

A continuación se muestra una serie de tablas que tienen como blanco al Segmento A, agrupadas según el genogrupo más conveniente como blanco. Éstas han sido ordenadas de modo que la secuencia marcada en gris es la perteneciente al partidor. Las letras en negrita corresponden a aquellas bases nitrogenadas que difieren de la secuencia del partidor. La columna 'Secuencias' exhibe la cantidad de muestras que presentan aquella secuencia. Cuando ésta contiene '0/12' es debido a que ninguna muestra presenta esta secuencia, sin embargo esta información es útil para comparar cuánto varían las Tm y los parámetros termodinámicos analizados.

Partidores que se alinean mejor con secuencias pertenecientes al genogrupo 1.

Bowers 1916 Forward					
AGGAGATGACATGTGCTACACCG	Secuencias	Tm (°C)	ΔG	ΔH	ΔS
AGGAGATGACATGTGCTACACCG	4/12	73,4	-29,2	-179,7	-485,0
<b>GGGAGACA</b> ACATGTGCTACACTG	8/12	55,1	-17,5	-130,1	-362,7
Bowers 1999 Reverse					
CCAGCGAATATTTTCTCCACCA	Secuencias	Tm (°C)	ΔG	ΔH	ΔS
CCAGCGAATATTTTCTCCACCA	0/12	70,1	-26,5	-168,1	-456,5
CCAGCGAATATTTTCTCCACTA	4/12	62,5	-21,5	-147,6	-406,5
CCAGCGA <b>AGATCTTCTCG</b> ACTA	1/12	36,9	-11,68	-97,2	-280,3
CCAGC <b>AAAGATCTTCTCG</b> ACTA	7/12	25	-8,34	-83,8	-247,9

Tabla 4.6: Comparación de temperaturas de mismatch con partidores descritos en Bowers *et al.* 2008.

WB117 F					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
GCGGTTCTGACTTCATTCTACA	0/12	69,9	-25,85	-164,4	-446,5
GCGGTTCTGACTTCATTCTACA	4/12	67,2	-23,3	-146,6	-397,9
<b>CAAGTTCTGACTTCCAGCTGGA</b>	8/12	33,3	-9,2	-72,1	-202,5
WB117 UPL					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
CTTGGGCT	4/12	39,0	-8,9	-55,1	-149,0
<b>ATGGGCCT</b>	8/12	-30,5	-1,2	-26,4	-81,3
WB117 R					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
GAGCTTGTCACGGAGACCAC	4/12	72,5	-26,3	-159,1	-427,9
<b>GAGCTGACCACTGTGACAAC</b>	8/12	30,7	-8,4	-79,3	-228,6

Tabla 4.7: Comparación de temperaturas de mismatch con partidores descritos en Calleja *et al.* 2012.

WB1 Forward					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC	0/12	72,6	-32,59	-211,2	-575,7
CCGCAACCTACTTGAGATCCATTATGC	2/12	70,1	-31,34	-197,6	-540,5
CCGCAACTTACCTGAGATCCATTATGC	1/12	70,1	-31,34	-197,6	-540,5
CCGCAACTTACCTGAGATCCATCATGC	1/12	67,9	-28,99	-184,2	-504,9
<b>CCGCAACTTACCTGAAATCCATTATGC</b>	8/12	65,6	-29,13	-181,9	-501,7
WB2 Reverse					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG	1/12	75,0	-34,0	-212,5	-575,2
CGTCTGGTTCAGATTCCACCTATAGTG	1/12	71,4	-30,6	-198,2	-540,1
CGTCTGGTTCGGATTCCACCTGTAGTG	2/12	70,5	-29,7	-193,7	-528,4
<b>CGTCTGGTTCGCATTCCATCTGTAGTG</b>	8/12	65,0	-23,9	-157,6	-430,9

Tabla 4.8: Comparación de temperaturas de mismatch con partidores descritos en Williams *et al.* 1999.

Partidores que se alinean mejor con secuencias pertenecientes al genogrupo 5.

Ariel Forward					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
TCCAAC TACGAGCTGATCCC	9/12	71,0	-25,2	-154,0	-415,1
TCCAAC TATGAGCTGATCCC	2/12	63,5	-20,1	-127,8	-347,2
TCCAAC TATGAGCCGATCCC	1/12	59,8	-18,1	-118,4	-323,2
Ariel Reverse					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
GTCCTCTCCTTGTACTCCTC	11/12	68,1	-23,8	-152,3	-413,9
GTCCTCTCCTTATACTCCTC	1/12	62,5	-20,4	-138,0	-378,8

Tabla 4.9: Comparación de temperaturas de mismatch con partidores que fueron obtenidos mediante una encuesta realizada dentro del país.

McBeath Forward					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
GCCAAGATGACCCAGTCCAT	8/12	72,1	-25,5	-152,4	-409,1
GCCAAGTTTACGCAGTCAAT	4/12	32,0	-8,8	-83,5	-241,3
McBeath Probe					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
CCGACCGAGAACAT	8/12	62,4	-17,4	-107,3	-289,8
CCAACGGAACTAAT	4/12	-23,6	-2,1	-35,8	-113,5
McBeath Reverse					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
TGACAGCTTGACCCTGGTGAT	8/12	73,4	-26,9	-159,7	-428,0
AGCCAGCCTGACCCTTGTAAAT	2/12	48,2	-14,8	-92,0	-253,5
GGCCAGCCTGACCCTTGTAAAT	2/12	46,1	-14,0	-87,8	-242,2

Tabla 4.10: Comparación de temperaturas de mismatch con partidores descritos en McBeath *et al.* 2007.

Taksdal Forward					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
ATCTGCGGTGTAGACATCAAAG	8/12	69,7	-26,4	-170,0	-462,6
ATCTGCGGAGTAGACATCAAAG	4/12	64,4	-23,2	-160,3	-441,7
Taksdal Reverse					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
TGCAGTTCCTCGTCCATCCC	12/12	74,1	-26,6	-155,5	-415,4

Tabla 4.11: Comparación de temperaturas de mismatch con partidores descritos en Taksdal *et al.* 2001.

SP8 F					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
CTGAACGGGACGCTCAAC	8/12	70,9	-24,0	-144,4	-388,1
CTGAACGGGACGCTCAAC	4/12	38,4	-10,1	-72,4	-200,8
CTCAACGGGACCCTGAAT					
SP8 UPL					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
GAAGGCAG	8/12	36,5	-8,4	-57,5	-158,2
GAAGGCAG	4/12	-2,2	-3,4	-35,9	-105,0
GAAGGAAG					
SP8 R					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
TCAGGCTCTCCACCTCAGAC	8/12	72,9	-25,9	-153,7	-411,8
TCAGGCTCTCCACCTCAGAC	4/12	69,8	-47,6	-144,6	-389,2
TCAGGCTCTCCACCTCAGAA					

Tabla 4.12: Comparación de temperaturas de mismatch con partidores descritos en Calleja *et al.* 2012.

Además se probó una pareja de partidores que tiene como objetivo al Segmento B y la sonda ('probe') respectiva. Cabe destacar que estos partidores son degenerados, es decir, contienen nucleótidos que pueden hibridar con más de una base nitrogenada de forma no Watson y Crick. Para esto las diferencias de temperatura han sido calculadas reemplazando la base degenerada por la que correspondería al apareamiento Watson y Crick.

VP1 Forward					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
GTTGATMMASTACACCGGAG	4/12	67,7	-23,2	-155,3	-423,3
GTTGATCAACTACACCGGAG	8/12	67,1	-23,6	-155,1	-423,5
GTTGATACAGTACACCGGAG					
VP1 Probe					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
TACATAGGCAAAACCAAA	11/12	61,6	-19,4	-130,9	-359,5
TACATAGGCAAAACCAAA	1/12	50,4	-14,4	-109,3	-306,3
TACATAGGAAAAACCAAA					
VP1 Reverse					
Secuencias	Tm (°C)	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	
AGGTCHCKTATGAAGGAGTC	4/12	68,4	-24,0	-153,0	-415,6
AGGTCACGTATGAAGGAGTC	8/12	67,9	-23,5	-148,5	-403,0
AGGTCCCTTATGAAGGAGTC					

Tabla 4.13: Comparación de temperaturas de mismatch con partidores descritos en Eissler *et al.* 2011. Los apareamientos no Watson y Crick son: M: A o C; S: C o G; H: cualquiera, menos G.

## **5. Discusión.**

### **5.1 Extracción de RNA y medición de su concentración.**

Dado que en la electroforesis algunas muestras presentaban una escasa cantidad de producto de PCR –como bandas débiles- y otras muestras simplemente no mostraban la banda esperada, el protocolo de extracción fue modificado en dos ocasiones a fin de ser optimizado.

En primera instancia se probó aumentando la cantidad de sobrenadante a extraer. Para esto se extrajeron 1200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, correspondientes a seis pasadas por la columna de extracción. Sin embargo esta modificación no dio resultados significativos que generaran un cambio permanente en el protocolo.

La segunda modificación al protocolo incluyó una digestión utilizando Proteinasa K, posterior al primer paso de la extracción, correspondiente a la lisis mediante el reactivo que proporciona el kit. Esto se realizó debido a que se creía que la polimerasa del virus, VP1, aún estaba unida en los extremos de las secuencias, sector que corresponde a áreas conservadas donde se unen los partidores. Una vez terminada la extracción, la medición de la concentración del RNA fue evidentemente mayor a las medidas habituales (el promedio de la concentración de RNA de las muestras enviadas a secuenciar fue de 18,29 ng/  $\mu\text{L}$ ), sin embargo se comprobó que esta modificación no resultó positiva para los objetivos esperados. Esto no era de esperarse, ya que la medición del control de extracción obtuvo un bajo valor, indicando que se trabajó prolijamente, por lo que se infiere que el tratamiento con proteinasa K propiamente tal no es lo que genera un aumento en la medición por parte del equipo Maestronano. Además posteriormente se practicó un qRT-PCR con partidores WB1 y WB2 (producto PCR de 206 pb posicionados entre los nucleótidos 139-344 del segmento A), el cual resultó positivo, por lo que el material genético del virus estaría presente en la muestra, mas no los extremos complementarios a los partidores utilizados.

<b>Muestra</b>	<b>[RNA] ng/uL</b>
Control de extracción	0,78
MPMA 1	70,76
LKJH 4	73,1
UV 2014	117,9

Tabla 5.1: Concentración de RNA de muestras tratadas con Proteinasa K

### **5.3 Curva de calibrado de temperatura de annealing para partidores A-A5EJ'NC\* y A-IPNVEJR\* para amplificación del Segmento A completo.**

Si bien la curva de calibrado indicó que 57,6°C es una buena temperatura para la amplificación del segmento A completo, utilizando este conjunto de partidores, se sugiere que en el futuro ésta se haga con una cantidad menor de templado de RNA inicial, de modo que se observe más claramente cuál es la mejor temperatura para alinear los partidores. Por otra parte, pueden existir diferencias entre distintos genogrupos, lo cual fue probado con muestras que habían sido secuenciadas previamente en este laboratorio y que habían sido agrupadas en los genogrupos 1 y 5 (no mostrado), sin embargo, 57,6°C nuevamente demostró ser una buena temperatura para el acoplamiento de éste par de partidores.

### **5.4 RT-PCR de segmentos A y B completos y electroforesis.**

Muchos RT-PCR fueron llevados a cabo, sin embargo no todas las muestras pudieron ser amplificadas correctamente. El segmento B es el que presenta menos problemas de amplificación, resultando positivo para gran parte de las muestras y su no amplificación constituye una verdadera excepción. No obstante el segmento A presenta variados problemas tales como bandas débiles o la absoluta no amplificación del segmento. Esto puede deberse a que el segmento A sea más variable en los extremos, lo cual es difícil de comprobar mediante este protocolo y la utilización de los partidores A-A5EJ'NC\* y A-

IPNVEJR\*, ya éstos están diseñados para acoplarse a una secuencia específica que, se piensa, no presentarían todos los virus.

El protocolo de RT-PCR en un paso fue modificado en una ocasión, en el cual la enzima de retrotranscripción utilizada fue “Affinity script” (Agilent Technologies), para probar con aquellas muestras que no habían logrado ser amplificadas. Además el tiempo y temperatura del paso de retrotranscripción fue modificado a 55 °C por 45 minutos. Esta modificación fue exitosa para la amplificación de las muestras EBPS 1 y EBPS 2, ambas para el segmento A. No se puede decir con certeza el por qué esta modificación resultó ser eficaz para estas muestras, mas no para otras que tampoco pudieron ser amplificadas con ninguna otra modificación del protocolo. El fabricante de esta enzima (Agilent Technologies) indica que se la recomienda para casos en que el material genético se pliega sobre sí mismo formando estructuras secundarias, también SantaLucia&Hicks (2004) hacen mención a las estructuras secundarias y cómo hay que tener éstas en cuenta al momento de realizar amplificación de material genético. Sin embargo sería necesario hacer todo un estudio enfocado en las estructuras secundarias que puede formar el material genético del virus IPN para aseverar que ésta fue la causa.

## **5.6 Purificación de cDNA y medición de su concentración.**

Una vez enviadas las muestras de los purificados de cDNA, OMICS Solutions envió las concentraciones de las muestras medidas en sus laboratorios en un equipo “Qubit 2.0” (Life Technologies), el cual cuantifica a través de fluorescencia. A continuación, la tabla 5.2 muestra la comparación entre las mediciones hechas en el Laboratorio de Virología y las medidas por OMICS Solutions. Estas diferencias se deben a que el equipo Maestronano es un espectrofotómetro, por lo que mide todo aquello que de alguna forma interaccione con las longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm y el equipo fluorímetro mide específicamente material genético. Como puede apreciarse en la tabla a continuación, no hay una relación lineal de las diferencias en la medición proporcionada por ambos equipos.

<b>Muestra</b>	<b>Mediciones de concentración ng/uL</b>	
	<b>Maestronano</b>	<b>Qubit 2.0</b>
ABCD 1A	17,0	5,8
ABCD 1B	23,6	10,0
CGPC 1A	20,0	8,0
CGPC 1B	19,1	14,4
CGPC 5A	25,7	14,2
CGPC 5B	20,1	16,2
CNJJ 2A	22,2	11,5
CNJJ 2B	37,0	24,0
EBPS 1A	24,1	8,1
EBPS 1B	20,7	17,5
EBPS 2A	18,1	5,6
EBPS 2B	22,6	16,1
IPNV 3A	9,9	1,7
IPNV 3B	15,2	5,5
IPNV 11A	17,7	2,7
IPNV 11B	11,2	2,2
LKJH 6A	17,2	4,7
LKJH 6B	15,0	8,2
MPMA 1A	35,1	23,0
MPMA 1B	20,9	16,4
PITR 1C A	11,3	3,5
PITR 1C B	15,7	9,3
RV 04A	18,6	7,8
RV 04B	18,5	10,1

Tabla 5.2: Concentración de cDNA medias en equipos Maestronano y Qubit 2.0

## 5.9 Edición de secuencias.

Para la edición de las secuencias fueron considerados aquellos nucleótidos de los cuales se tenía una alta certeza de identidad, es por esto que no se quiso agregar información que no estaba explícita, situación que se da en los extremos y es ésta la razón por la cual las secuencias resultantes de este trabajo tienen distintas longitudes.

Durante la edición de las secuencias se hizo evidente que aquellos 'contigs' provenientes del primer ensayo, aquel donde todas las lecturas eran puestas en un ensamblaje, era el que más diferencias presentaba con respecto a la secuencia consenso que resultó finalmente. Por otra parte los contigs provenientes del tercer y cuarto ensayo fueron los que necesitaron menor edición. Tomando en cuenta que el chip 314 de ION Torrent ofrece hasta 550 mil lecturas, al aumentar la concentración de purificados de cDNA sería posible llegar a esa cifra, para utilizar sólo aquellas lecturas de mayor tamaño y así facilitar el proceso de ensamblaje, utilizando principalmente los ensayos de ensamblaje tipo tres y cuatro.

Si bien los contigs formados tenían un tamaño mayor al esperado, como se mencionó anteriormente, esto resultó no ser un problema, debido a que al alinearlos se hizo notorio que gran parte de los nucleótidos sobrantes se encontraban en los extremos de las secuencias. Además se observó que el error que más se repite tiene que ver con la adición de nucleótidos. En primer lugar se observó que, en ocasiones, nucleótidos son agregados inespecíficamente entre las secuencias, lo cual es fácilmente detectable al comparar entre contigs y comparando tanto la secuencia nucleotídica como aminoacídica con las secuencias de referencia. El segundo error que se observa tiene que ver con que, al parecer, el secuenciador sobreinterpreta señales repetidas. Por ejemplo en casos en que se presentan repeticiones de un nucleótido, el secuenciador puede interpretar hasta tres veces más el nucleótido.

También observó que había sitios en los cuales se presentaban variaciones de nucleótidos que no generaban un cambio de aminoácido en la traducción a proteínas o que ambas variantes que se presentaban eran posibles cuando se comparaban con las distintas secuencias de referencia (tanto nucleotídicas como aminoacídicas). Se cree que cuando estas variaciones se presentaban uniformemente en los distintos contigs que se generaron con el programa Codon Code Aligner puede deberse a que dentro de una

misma muestra los distintos virus individuales presentan estas variaciones, tal como plantean Domingo & Holland (1997) al hablar de que los virus constituyen un enjambre mutante de cuasiespecies. Sin embargo, para generar la secuencia consenso, fueron tomados en cuenta aquellos nucleótidos que tenían mayor representatividad en los contigs.

### **5.10 Árboles filogenéticos.**

Si bien, anteriormente, las muestras habían sido secuenciadas por el fragmento de 1180 pb, el árbol filogenético resultante obtiene valores de bootstrap muy bajos comparados a los valores obtenidos por medio de la comparación de los segmentos completos. También en el trabajo de Blake *et al.* 2001 se muestra un árbol filogenético construido con un fragmento perteneciente al segmento A, el cual muestra valores de confianza más bajos. Esto reafirma que al comparar la información genética total se puede identificar con mayor confianza la filogenia del virus.

Otro punto de discusión, guarda relación con los extremos no codificantes, ya que la mayoría de las secuencias clásicas de referencia disponibles en GenBank no poseen estos extremos. Dado que para generar árboles filogenéticos, los modelos diseñados para esto exigen secuencias de igual longitud (lo cual puede ser reemplazado con espacios, sin embargo disminuye demasiado la calidad del bootstrap), se hace evidente la necesidad de aumentar las secuencias completas del virus IPN en GenBank. De todas formas se hicieron árboles filogenéticos considerando estos extremos (no mostrado) y es notorio que los valores de bootstrap no varían significativamente, sin embargo se prefirió mostrar los datos de filogenia generados sólo con las secuencias codificantes para no dañar la sistematicidad de utilizar secuencias de igual longitud.

Además se evidencia que en las secuencias virales analizadas en este estudio no se encontraron reordenantes, dado a que todas las muestras analizadas pertenecen al mismo genogrupo, independiente de la comparación según segmento A o B.

### 5.10.1 Motivos de virulencia.

Como se evidenció en la tabla 4.4 los motivos de virulencia descritos en la literatura se muestran sólo en aquellas secuencias familiarizadas con el mismo genogrupo al cual pertenece el serotipo utilizado para estos estudios (genogrupo 5, serotipo Sp). Además, según los estudios de Santi *et al.* 2004 y Song *et al.* 2005, el aminoácido treonina en la posición 221 sería característica de aquellas cepas avirulentas, por lo que, según esta clasificación, todas las muestras analizadas en este trabajo, pertenecientes al genogrupo 1, tendrían esta condición. Sin embargo es evidente que esta situación no es tal, por lo que la comparación de sólo estos residuos aminoacídicos es insuficiente para aseverar si un virus, independiente del genogrupo al cual pertenezca, es virulento, medianamente virulento o avirulento. Además, cuando se compararon los fragmentos correspondientes a la parte codificante de la proteína VP5, se vio que casi todas las muestras presentan la VP5 de 133 aminoácidos, salvo las muestras IPNV11 y PITR1C, las cuales presentaron codones de término prematuros que conducirían a la producción de una proteína truncada de 29 aminoácidos.

Asimismo en diversas publicaciones se hace mención a que con las pasadas por cultivo celular, los virus van atenuando su virulencia (Santi *et al.* 2004). Es por esto que se cree que algunas secuencias, sobre todo para aquellas secuencias del genogrupo 5 –ya que el fenómeno está estudiado para serotipo Sp (Song *et al.* 2005)-, puedan haber perdido el motivo de virulencia, ya que las muestras habían sido pasadas por cultivo celular dos o tres veces. Esto se ve observado principalmente en la línea celular CHSE-214, a la cual los virus se adaptan rápidamente (Santi *et al.* 2004) y es la línea que se ha utilizado en este estudio para generar los aislados virales. En una publicación de Skjesol y colaboradores (2011), se hace alusión a que estos cambios adaptativos podrían promover la mantención del virus, de modo que, decayendo la mortalidad, puedan mantenerse en individuos, y por tanto en el medio, por más tiempo.

Tomando en cuenta todos estos antecedentes, se hace evidente que el camino para comprender los motivos de virulencia de virus IPN parece estar recién comenzando a cimentarse.

### 5.11 Comparación de temperaturas de mismatch de partidores utilizados para diagnóstico.

De la comparación de las temperaturas de mismatch es posible observar que los partidores utilizados para diagnóstico tienen como blanco principal a individuos de sólo un genogrupo, lo cual puede no ser un problema mayor en otros países, como por ejemplo en Estados Unidos (Williams *et al.* 1999), de donde provienen muchos estudios, debido a que los virus allí presentes son endémicos y pertenecen principalmente a genogrupos que han coevolucionado localmente. Sin embargo en las aguas de nuestro país se presentan variados genogrupos, probablemente por la múltiple introducción desde diversos orígenes, lo que genera un conflicto difícil de sortear al momento de diagnosticar al virus.

Si hizo notorio que, dependiendo del nucleótido que cambia, además de su posición en el partidor, las diferencias de  $T_m$  pueden llegar a ser de 40 °C para los partidores. También los valores de  $\Delta G$  aumentan, evidenciando una baja en la espontaneidad de la reacción de unión de los partidores con la secuencia blanco. Estos cálculos pueden demostrar el por qué algunos partidores no pueden diagnosticar muestras de aislado viral que han podido ser diagnosticados con el virus IPN a través de pruebas inmunológicas.

Es por esto que el uso de partidores degenerados parece una buena opción, ya que, como se vio con el conjunto de partidores 'VP1' (Eissler *et al.* 2011), su uso sortea de buena forma las diferencias. Además estas diferencias se ven agrupadas por genogrupos, por lo que pueden utilizarse para variar los partidores previamente diseñados por otros investigadores y así cubrir de mejor manera a las variantes presentes en nuestras aguas. De esta forma uno de los partidores comúnmente utilizados que tiene como blanco al segmento A: WB1-WB2 (Williams *et al.* 1999), podría mejorarse con el uso de nucleótidos degenerados, quedando:

WB1\* 5'-CCGCAACYTACYTGARATCCATYATGC-3' y

WB2\* 5'-CGTCTGGTTCRSATTCCAYCTR TAGTG-3'.

Estos cambios cubren todas las opciones que se presentaron en las muestras secuenciadas en este trabajo.

Es curioso que la muestra IPNV3 haya presentado diferencias con la sonda del set VP1, ya que, hasta el momento, se creía que ésta se encontraba en una zona totalmente conservada. Si bien esto no complicó su detección mediante el qRT-PCR de diagnóstico que se le realiza a las muestras con estos partidores y que es sólo una diferencia, es necesario tener en cuenta que el sector de unión de la sonda puede presentar variaciones.

Por lo demás, el uso de RT-PCR dirigido al segmento B parece ser una mejor opción, ya que la comparación de las muestras secuenciadas en este estudio, muestras que habían sido secuenciadas previamente en este laboratorio y secuencias de referencia publicadas en GenBank, muestran mayor identidad del segmento B, con un porcentaje de 88,6% contra un 86,4% de identidad que muestra el segmento A. Cuando estas secuencias son traducidas a la secuencia aminoacídica, la identidad del segmento B sigue siendo mayor con un 94,4%, contra un 80,3% del segmento A.

## **6. Conclusiones.**

- Doce muestras de material genético viral, correspondientes a ambos segmentos completos, fueron amplificadas exitosamente para su secuenciación.
- Los amplificadas de los segmentos A y B de los virus presentes en las muestras secuenciadas, se ensamblaron exitosamente. Los métodos de ensamblaje más adecuados fueron los tipo tres y cuatro.
- De los aislados virales secuenciados en este trabajo, provenientes de distintos centros piscicultores del país, cuatro pertenecen al genogrupo 1 y ocho pertenecen al genogrupo 5.
- No se observaron eventos de reordenamiento de los segmentos genómicos virales.
- Utilizar ORF's completos en la construcción de árboles filogenéticos entrega mejores valores de bootstrap, aumentando su confiabilidad respecto de los árboles construidos con fragmentos menores.
- Los motivos de virulencia descritos en la literatura son insuficientes para explicar la virulencia asociada a las cepas chilenas.
- Diferencias entre las secuencias de los partidores y las secuencias blanco, generan dificultades en el diagnóstico del virus IPN.
- El uso de partidores degenerados es una mejor alternativa para sortear los problemas relacionados a la variabilidad genética, en la detección de virus IPN mediante RT-PCR.

## **7. Referencias.**

Agilent Technologies [internet]. Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit. Disponible en: <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/600559.pdf> [Fecha consulta 28-Noviembre-2014]

Bahar M., Sarin L.P., Graham S.C., Pang J., Bamford D.H., Stuart D.I y Grimes J.M. 2013. Structure of a VP1-VP3 complex suggests how birnaviruses package the VP1 polymerase. *Journal of Virology*. 87(6): 3229–3236.

Bain N., Gregory A. y Raynard R.S. 2008. Genetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus from Scotland. *Journal of Fish Diseases* 31(1): 37-47.

Blake S., Ma J.Y., Caporales D.A., Jairath S. y Nicholson B.L. 2001 Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Diseases of Aquatic Organisms* 45: 89-102.

Blake S., Schill W., Mcallister P., Lee M., Singer J. y Nicholson B. 1995. Detection and Identification of Aquatic Birnaviruses by PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. p 835-839.

Bowers R. M., Lapatra S. E. y Dhar A. K. 2008. Detection and quantitation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non lethal tissue sampling. *Journal of Virological Methods*. 147(2):226-234.

Buschmann A.H., Cabello F., Young K., Carvajal J., Valera D. A. y Henríquez L. 2009. Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: Analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Review. Ocean & coastal management* 52: 243-249.

Calleja F., Godoy M. G., Cárcamo J. G., Bandín I., Yáñez A. J., Dopazo C. P., Kibenge F. S. y Avendano-Herrera R. 2012. Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) assays with Universal Probe Library (UPL) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated in Chile. *Journal of Virological Methods* 183: 80–85.

Coulibaly F., Chevalier C., Delmas B. y Rey F.A. 2010. Crystal Structure of an Aquabirnavirus Particle: Insights into Antigenic Diversity and Virulence Determinism. *Journal of Virology*.84(4):1792–1799.

Crane M. St. J., Hardy-Smith P., Williams L. M., Hyatt A. D., Eaton L. M., Gould A., Handler J., Kattenbelt J. y Gudkovs N. 2000. First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*. 43: 1–14.

Dobos, P. 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annual Review of Fish Diseases* 5: 25-54.

Domingo E. y Holland J. J. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology*. 51:151–78.

Eissler Y., Pavlov M. S., Conejeros P., Espinoza J. C. y Kuznar J. 2011. Detection and quantification of Chilean strains of infectious pancreatic necrosis virus by real-time RT-PCR assays using segment B as a target. *Latin American Journal of Aquatic Research* 39(3): 9.

Espinoza E., Farías G., Soler M. y Kuznar J. 1985. Identity between Infectious Pancreatic Necrosis Virus VR-299 and a Chilean Isolate. *Intervirology* 24: 58-60.

Espinoza J.C. y Kuznar J. 2002. Rapid simultaneous detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Journal of Virological Methods* 105:81–85

FAO. 2002. [internet] El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/y7300s/y7300s05.htm> [Consulta 4-Julio-2014]

Guerrero L., Herrera E., Salinas J., Torres J., Montero A. B. y Barrón B. 2008. Detection and Genotyping of an Infectious Pancreatic Necrosis Virus from Asymptomatic Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Facilities in Mexico. *Intervirology* 51:285–292

Hill B.J. y Way K. 1995. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquabirnaviruses. *Annual Review of Fish Diseases*, Vol 5, pp. 55-77

Life Technologies [internet] Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements. Technical note. Disponible en: <https://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/Laboratory%20Instruments/Files/1014/Qubit-fluorometric-quantitation-vs-spectrophotometer-measurements.pdf>[Consulta 28-Noviembre-2014]

McAllister P.E. y Reyes X. 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *Journal of Fish Diseases* 7: 319-322.

McBeath A.J.A., Snow M., Secombes C.J., Ellis A.E. y Collet B. 2007. Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish & Shellfish Immunology*. 22(3.): 230–241

Montero C. 2004. Formación y desarrollo de un cluster globalizado: el caso de la industria del salmón en Chile. CEPAL, Naciones Unidas, Santiago de Chile.

Mortensen S. H., Nilsen R. K. y Hjeltnes B. 1998. Stability of an infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolate stored under different laboratory conditions. *Diseases of Aquatic Organisms* 33: 67-71.

Mutoloki, S. y Evensen O. 2011. Sequence similarities of the capsid gene of Chilean and European isolates of infectious pancreatic necrosis virus point towards a common origin. *Journal of General Virology* 92(7): 1721-1726.

Gregory, A. y Munro L. A., et al. 2007. Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from the environment in the vicinity of IPNV-infected Atlantic salmon farms in Scotland. *Journal of Fish Diseases* 30(10): 621-630.

Munro E. S. y Midtlyng P. J. Infectious Pancreatic Necrosis and Associated Aquatic Birnaviruses. En: Woo P. T. K. y Bruno D. W. Infectious Necrosis Pancreatic and associated aquatic birnaviruses. *Fish Diseases and Disorders*. Volume 3. Viral, bacterial and fungal infections. 2011. 2da Edición. Escocia, Reino Unido: CAB International. Págs. 1-65.

Nelson D. L. y Cox M. M. Lehninger. Principios de bioquímica. Quinta edición. 2009. Pág. 293-294.

Nishizawa T., Kinoshita S. y Yoshimizu M. 2005. An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region. *Journal of General Virology*. 86: 1973–1978

OIE 2009 Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.

Omega Bio-tek [internet]. E.Z.N.A.® Total RNA Kit I Disponible en: <http://omegabiotek.com/store/product/total-rna-kit-i/> [Fecha consulta 28-Noviembre-2014]

Ørpetveit I., Mikalsen A. B., Sindre H., Evensen Ø., Dannevig B. H. y Midtlyng P. J. 2010. Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in subclinically infected Atlantic Salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 22: 886.

Ortega C. y Enríquez R. 2007. Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). *Archivos de Medicina Veterinaria*. 39(1). Revisión bibliográfica.

Rimstad E. 2003. IPN in salmonids. A review. VESO, Noruega.

Rimstad E., Hornes E., Olsvik Ø y Hyllseth B. 1990. Identification of a Double-Stranded RNA Virus by Using Polymerase Chain Reaction and Magnetic Separation of the Synthesized DNA Segments. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(10):2275-2278.

Rodriguez Saint-Jean S., Borrego J.J. yPerez-Prieto S.I. 2001. Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. *Journal of Virological Methods* 97:23–31.

Romero-Brey I., Bandín I., Cutrín J.M., Vakharia V.N. y Dopazo C.P. 2009. Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases* 32: 585–595.

Saitou N. y Nei M.1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-25.

SantaLucia J. Jr., y Hicks D. 2004. The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structures* 33:415–40.

Santi N., Song H., Vakharia V. y Evensen Ø. 2005. Infectious Pancreatic Necrosis Virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. *Journal of Virology* 79(14): 9206-9216.

Santi, N., Vakharia V. y Evensen Ø. 2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 322(1): 31-40.

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. 2014 [internet]. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos año 2013. Ministerio de economía, fomento y turismo. Chile. Disponible en: [http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=8014](http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=8014) [Consulta 28-Noviembre-2014]

Skjesol A., Skjæveland I., Elnæs M., Timmerhaus G., Fredriksen B. N., Jørgensen S. M., Krasnov A. y Jørgensen J. B. 2011. IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. *Virology Journal* 8:396.

Song H., Santi N., Evensen Ø. y Vakharia V. 2005. Molecular determinants of Infectious Pancreatic Necrosis Virus virulence and cell culture adaptation. *Journal of Virology*. 79(16):10289-10299.

Taksdal T., Dannevig B.H. y Rimstad E. 2001. Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists* 21(5): 214.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., y Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.

Thompson J., Higgins D.G. y Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *NucleicAcidsResearch*. Vol. 22, No. 22. 4673-4680.

Viralzone [internet] Aquabirnavirus. Disponible en: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/571.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/571.html) [Consulta 28-Noviembre-2014]

Williams K., Blake., Sweeney A., Singer J.T. y Nicholson B.L. 1999. Multiplex Reverse Transcriptase PCR Assay for Simultaneous Detection of Three Fish Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (12): 4139-4141.

Yao K. y Vakharia V. 1998. Generation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus from Cloned cDNA. *Journal of Virology*. 72(11):8913-8920.

## **8. Anexos.**

### **8.1 Secuencias de referencia utilizadas en este estudio.**

Secuencias de referencia segmento A.

Número de acceso genbank	Nombre secuencia
AY780920.3	17F2
AY780921.3	19F3b
AY780922.3	19G3e
AY780924.3	20G1d
AY780918.3	5B1d
AY780919.1	6B1a
AF343570.1	91-137
AF342729.1	Ab
AY283780.1	AM-98
AF343573.1	Buhl
AF342732.1	Canada 1
AF342733.1	Canada 2
AF342734.1	Canada 3
JF440810.1	Connecticut-1
AF343571.1	Dry mills
AY026483.1	Fr21
AF342730.1	He
AF342735.1	Jasper
AY374435.1	NVI-001
AY379744.1	NVI-010
AY379735.1	NVI-011
AY379738.1	NVI-013
AY379740.1	NVI-015
AY379742.1	NVI-016
AY379736.1	NVI-020
AY379737.1	NVI-023
DQ536090.1	S-IPNV/FS12-01
DQ536091.1	S-IPNV/SH96
AF342728.1	Sp
AY823632.1	Sp103
AF342731.1	Tellina 2
AF343572.1	VR299
AF342727.1	West Buxton

Secuencias de referencia segmento B.

Número de acceso genbank	Nombre secuencia
AJ489244.1	578
AJ489238.1	1146
AJ489239.1	2284
AJ489240.1	2290
AJ489241.1	2310
AJ489242.1	2462
AY780927.1	17F2
AY780928.1	19F3b
AY780929.1	19G3e
AY780930.1	19G7e
AY780931.1	21Gd
AJ489243.1	24R
AJ622823.1	31-75
AY780925.1	5B1d
AY780926.1	6B1a
AJ489245.1	88R
AY129664.1	AM-98
D26527.1	DRT
AY129665.1	H1
M58756.1	Jasper
NC_001916.1	Jasper.2
EU665685.1	Mexico
AY129666.1	NC1
AY379739.1	NVI-013
AY379741.1	NVI-015
M58757.1	Sp
AY823633.1	Sp103
AY354522.1	Sp103.2
AY354523.1	Sp116
AY354524.1	Sp122
AF078669.1	West Buxton
AY129662.1	Y-6
AY129663.1	YT-01A

## 8.2 Parámetros para ensamblaje de secuencias por cada ensayo.

Muestra	Datos crudos	Menores a 100	Menores a 60
ABCD 1	29971	3760	383
CGPC 1	22200	2303	278
CGPC 5	30177	2821	340
CNJJ 2	28961	3710	416
EBPS 1	15691	2120	252
EBPS 2	17309	2260	254
IPNV 3	14417	2407	229
IPNV 11	98302	17451	1448
LKJH 6	109426	16077	1617
MPMA 1	108920	13696	1772
PITR 1C	20545	3411	277
RV 04	14125	1701	185

La columna 'Datos crudos' representa la cantidad de lecturas entregada por la secuenciación realizada por OMICS Solutions; las columnas 'Menores a...' representan las lecturas que presentaron un largo menor a 100 pb y puntaje de calidad menor a 60, correspondientemente.

Muestra	Primer ensayo	Segundo ensayo	Tercer ensayo
ABCD 1	25828	5000	14847
CGPC 1	19619	5000	6431
CGPC 5	27016	5500	13366
CNJJ 2	24835	5000	9948
EBPS 1	13319	5000	2718
EBPS 2	14795	5000	1991
IPNV 3	11781	5000	7297
IPNV 11	79403	10000	53756
LKJH 6	91732	10000	20711
MPMA 1	93452	10000	41612
PITR 1C	16857	5000	5364
RV 04	12239	4000	5672

Los ensayos corresponden a la cantidad de lecturas utilizadas en cada ensayo (descritos en Materiales y métodos). Las lecturas utilizadas en el segundo ensayo son una aproximación.

### 8.3 Secuencias completas de segmentos A y B.

#### Muestra ABCD1. Segmento A

GAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAAGAGC  
TCTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAATAACCAACAATTCCATCTACATGAA  
TCATGAACACAACAAAGGCAACCGCAACCTACTTGAGATCCATTATGCTTCCCGAGAA  
TGGACCAGCAAGCATTCCGGACGACATAACAGAGAGACACATACTAAAACAAGAGAC  
CTCATCATACTTAGAGGTCTCCGACTCAGGAAGTGGGCTTCTTGTCTGCTTCCCT  
GGGGCTCCTGGATCCAGAGTCGGTGCCCACTACAGGTGGAATCCGAACCAGACGGA  
ACTGGAATTCGACCGGTGGTTGGAACATCACAGGACCTGAAGAAAGCATTCAACTA  
CGGGAGGTTGATCTCACGAAATACGACATCCAGAGCTCGACCCTTCCCGCTGGCCT  
CTATGCACTCAACGGGACCCTGAATGCAGCTACCTTCGAAGGAAGTCTTTCTGAGGT  
GGAGAGCCTGACCTATAACAGCTTGATGTCCCTGACAACAACCCCCAGGACAAGGT  
CAACAACCAACTAGTGACCAAAGGAATAACCGTCCTGAACCTTCCAAGTGGGTTTGAC  
AAGCCATACGTCCGCCTTGAGGACGAGACACCGCAGGGCCCCCAGTCCATGAACGG  
AGCCAGGATGAGGTGCACCGCTGCAATCGCACCAAGGAGGTACGAAATAGACCTCC  
CATCTGAGCGCCTACCAACCGTGGCAGCAACTGGGACCCCAACAACAATCTATGAAG  
GGAACGCCGACATTGTGAATTCAACCACAGTGACAGGAGACGTAACCTTCCAAGTAG  
CAGCCGAACCCGTCAATGAGACGCGGTTGACTTCATCCTACAATTCTTGGGCTTG  
ACAATGATGTGCCCGTGGTCTCCGTGACAAGCTCAACCCTGGTCACGGCCGACAAC  
ACAGGGGTGCCTCCGCCAAGTTTACGCAGTCAATCCCAACGGAACATAAATAAGC  
CCATTACAAGGGTCAGGCTGGCTTATCAGCTCAACCAGCAGACCGCAATCGGAAACG  
CCGCAATACTCGGGGCCATAGGACCCGCGTCAGTCTCATTCTCATCAGGGAATGGCA  
ATGTGCCGGGGTTCTAAGACCCATAACCTTGGTGGCATAACGAGAAGATGACCCCCC  
AGTCAATTCTGACCGTGGCTGGCGTATCCAAGTATGAGCTGATCCCCAACCCAGACC  
TCCTAAAGAATATGGTCACCAAGTATGGCAAATATGACCCTGAGGGCCTTAACTATGC  
CAAGATGATCCTATCCACAGGGAGGAGCTAGACATCAGAACTGTCTGGAGGACCGA  
GGAGTACAAGGAGAGGACAAGAGCCTTCACTGAGATCACTGACTTTACAAGTGACCT  
GCCAACATCAAAGCATGGGGGTGGAGAGACCTGGTCAGAGGCATCAGAAAAGTGG  
CAGCACCAGTGCTGTCAACGCTCTTCCCAATGGCCGCCCACTTATAGGTGCGGCCG  
ACCAGTTCATCGGTGACCTACCAAGACCAACTCAGCCGGGGGGCGCTACCTGTCA  
CATGCAGCTGGAGGCCGCTACCGTGATGTCATGGACACATGGGCCAGTGGCTCCGA

GACAGGAAGCTACTCAAAGCACCTTAAGACCCGGCTTGAGTCCAACAACCTATGAGGA  
AGTGGAGCTTCCCAAGCCAACAAAAGGAGTCATCTTTCCTGTGGTGCACACCGTAGA  
AAGTGCACCAGGTGAGGCCTTCGGGTCGCTCGTGGTTGTGATACCAGGAGCATAACC  
CGGAACTTCTTGACCCAAACCAACAGGTCTATCCTACTTCAAGAACGACACAGGCT  
GTGTCTGGGGGATAGGAGAAGACGTTCCATTTGAAGGAGATGACATGTGCTACACCG  
CACTGCCCTAAAGGAGATCAAGAGGAACGGCAACATCGTAGTGGAGAAAATATTCG  
CTGGCCCTGCGATGGGACCGTCGGCCCAACTTGCCTGTCCCTACTAGTCAACGAC  
ATAGACGAGGGGATTCCAAGGATGGTCTTCACAGGGGAGATTGCTGATGACGAGGAA  
ACAGTCATCCCGATCTGCGGAGTAGACATCAAAGCCATTGCCGCCCATGAACATGGG  
CTGCCACTCATTGGCTGCCAACCAGGGGTCGACGAGATGGTGGCAAACACATCTCTC  
GCATCACACCTGATTCAGAGCGGCCCTACCAGTGCAGAAAGCACAGGGGGCCTG  
CAGGAGAATCAAGTACCTGGGCCAACTGATGAGAACAACCTGCATCAGGGATGGACGA  
GAACTGCAGGGGCTGCTGCAGGCCACCATGGCCAGAGCAAAGGAAGTCAAGGACG  
CCGAGGTGTTCAAACCTCCTGAAGCTGATGTCCTGGACACGGAAGAACGACCTCACAG  
ACCACATGTACGAGTGGTCAAAGAGGACCCTGATGCAATCAAGTTTGGCAGGCTCA  
TCAGCACCCCCCAAACACCAAGAGAAGCCAAAAGGACCTGACCAGCACACCGCC  
CAGGAGGCAAAGCAACCAGAATATCACTGGACGCCGTCAAAGCCGGAGCAGACTTT  
GCCTCACCCGAGTGGATTGCAGAGAACAACCTACCGCGGTCCAGCCCCAGGTCAGTT  
CAAGTACTGCATGATAACGGGCAGAGTCCCAAACCCCGGAGAAGAGTACGAGGACC  
ACGTGCGAAAACCGATAACCCGACCAACCGACATGGACAAGATCAGACGCCTAGCCA  
ACAGTGTTTACGGACTACCCACCAAGAGCCCGCACCGGACGACTTCTACCAAGCAG  
TCGTGAGGTGTTCCGCGAGAATGGGGGGAGAGGACCCGACCAAGACCAAATGCAA  
GACCTGAGGGACTTGGCAAGGCAGATGAAACGACGACCCAGACCAGCTGATGCACG  
CAGGCAAACCAGGACTCCACCGAGGGCGGCAACCTCCGGTGGTTCACGGTTTACCC  
CCTCCGGCGACGACGGAGAAGTGTAACGACTACTCTTTTCCTGACTG

## Muestra ABCD1. Segmento B

GAAACAGTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATACCACGACTGTTTATGTATGCAC  
GCAAGTGCCCTTAACAAATTTCTATACACAACTCATGATATGTCCGGACATCTTCAA  
CTCACCACAGAACAAGGCTTCTATCTTGAGCGCTCTAATGAAGAGCACAGCAGGAGA  
TG TAGAGGATGTGCTAATACCAAACGCTTCAGGCCCGCCAAGGACCCCTTGACAA  
CCCTCAGGCAGCAGCACAGTTCCTGAAGGACAACAAGTATCGGATACTTAGGCCGCG  
AGCCATTCCGACCATGGTTCGAACTAGAGACAGATGCCGCTCTGCCCCGACTGCGACA  
AGTGGTGGACGATGGCAAGCTTAAGGACACGGTAAGCGTCCCAGAAGGAACCACTG  
CGTTCTACCCCAAATACTATCCATTCCACAAGCCAGACCATGATGAGGTGGGGACGT  
TCGGGGCTCCGGACATCACGCTTCTGAAGCAACTTACCTTCTTCTGTTGGAGAACG  
ACTTCCCACAGGACCAGATACACTCAGGCAGGTACGTGAGGCCATAGCTACACTCC  
AGTATGGATCAGGCAGCTACTCCGGACAGCTAAACAGGCTTCTGGCCATGAAGGGAG  
TTGCAACCGGCAGGAATCCAAACAAGACTCCAAAACAGTAGGCTACACAAACGAGC  
AGCTAGCAAAACTGCTGGAGCAGACACTACCGATCAACACCCCAAAACATGAGGACC  
CCGACCTCCGGTGGGCCCCAGCTGGTTGATCAACTACACCGGAGACCTGAGCACA  
GACAAGTCATACCTGCCACACGTGACTATAAAGTCCTCAGCCGGCCTACCCTACATA  
GGCAAACCAAAGGAGACACGACTGCAGAGGCGCTCGTACTGGCTGACTCCTTCATA  
CGTGACCTCGGAAAAGCAGCCACATCAGCCGATCCAGAAGCGGGAGTGAAGAAAAC  
CATTACTGACTTCTGGTACCTGAGCTGTGGGCTGCTCTTCCCGAAGGGCGAGAGATA  
CACACAGATTGACTGGGACAAGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCGCCCTACCCAAC  
ACACCTACTACTATCAATGGTGTTCATCCCCAGTAATGGACGAGTCAAACTCAACATT  
ACCAACACCCAGACACCATCTCTGTATGGGTTCTCCCCATTCCACGGAGGGATGGAC  
AGAATCATGACCATCATCAGAGACAGTCTGGACAACAACGAGGACCTAGTGATGATC  
TATGCAGACAACATTTACATACTGCAGGACAACACGTGGTACTCAATAGACCTAGAAA  
AGGGCGAGGCCAACTGCACTCCACAACACATGCAGGCCATGATGTA CTACCTCCTGA  
CCAGGGGGTGGACAAACGAGGATGGCTCTCCGCGGTACAATCCGACATGGGCAACA  
TTCGCCATGAATGTGGCCCCGTCGATGGTCGTGGACTCCTCCTGTCTTCTGATGAAC  
CTTCAGCTGAAGACCTACGGCCAGGGCAGTGGGAACGCCTTTACCTTCTTAAACAAC  
CACCTCATGTCAACGATCGTCGTGGCCGAGTGGGTAAAAGCCGGGAAGCCAAACCC  
CATGACAAAAGAGTTCATGGACCTCGAGGAGAAGACGGGGATCAACTTTAAGATAGA  
GCGCGAGCTAAAGAACTTGAGAGAAATCATCATCGAGGCCGTGGAGACGGCCCCC  
AGGATGGCTACCTCGCCGATGGCTCCGATTTACCCCGAACAGACCAGGGAAAGCC

GTCGAGCTAGACCTTCTTGGCTGGTCAGCCATCTACAGCCGCCAAATGGAGATGTTC  
GTCCCAATCCTCGAGAACGAGCGACTAATTGCCTCAGCGGCCTACCCCAAGGGGCTT  
GAGAACAAGACCTTGGCCCGGAAACCCGGGGCCGAGATTGCGTACCAGATAGTGCG  
GTATGAAGCAATCAGGCTGGTGGGCGGCTGGAACAATCCACTGCTAGAAACAGCAG  
CCAAACACATGTCCCTTGACAAGAGAAAGAGACTGGAGGTGAAGGGGCTGGACGTC  
ACCGGGTTTCTAGATGCCTGGAACGATATGTCAGAATTCGGCGGAGACCTGGAAGGC  
ATAACGCTGTCCGAGCCCCTCACAAACCAAACCTCTGATTGACATCAACACACCCCTG  
GAGAGCTTCGACCCCAAAGCCAGGCCACAAACACCACGGTCACCAAAGAAAACCCCTG  
GACGAGGTGACGGCTGCCATTACATCAGGGACCTACAAGGACCCCAAGAGCGCAGT  
GTGGCGACTGCTAGACCAAAGGACCAAACCTCCGGGTCAGCACACTGCGAGACCAAG  
CGTCAGCACTGAAACCAGCCTCGTCCTCGGTGACAACCTGGGCCGAAGCCACAGAG  
GAGCTAGCGGAGCAACAACAACCTTCTCATGAAGGCCAACAACCTGCTAAAGAGCAGC  
TTGACGGAAACAAGAGAGGCACTGGAGACCATCCAGTCTGACAAAATCATCACCGGG  
AAGTCCAACCCTGAAAAGAACCCAGGGACCGCAGCCAACCCCGTGGTTGGCTACGG  
GGAATTCAGCGAGAAGATTCCTCTGACTCCCACGCAGAAAAAGAATGCCAAGCGGAG  
GGAGAAGCAGAGAAGAAACCAGTAAGAAGACCCAACCGGGAAGAATCCGAAATGAC  
CCAGCTGGACTCATATGCAAGCTCCGCGCCGCAAGGCAAGCTGAACCAAAGTAGTGA  
CCCGACAATGTGCCACCAACATGACCCCTGAA

## Muestra CGPC1. Segmento A

GAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAGGAGC  
TCTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAACAAACAAACAATCTATATCAATGCA  
AGATGAACACAAACAAGGCAACCGCAACTTACCTGAAATCCATTATGCTTCCAGAGAC  
TGGACCAGCAAGCATCCCGGACGACATAACGGAGAGACACATCCTAAAACAAGAGAC  
CTCGTCATAACAACCTAGAGGTCTCCGAATCAGGAAGTGGCATTCTTGTTTGTTCCT  
GGGGCACCAGGCTCACGGATCGGTGCACACTACAGATGGAATGCGAACCAGACGGG  
GCTGGAGTTCGACCAGTGGCTGGAGACGTGCGCAGGACCTGAAGAAAGCCTTCAACT  
ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGACATCCAAAGCTCCACACTACCGGCCGGTC  
TCTATGCTCTGAACGGGACGCTCAACGCTGCCACCTTCGAAGGCAGTCTGTCTGAGG  
TGGAGAGCCTGACCTACAACAGCCTGATGTCCCTAACAAACGAACCCCCAGGACAAAG  
TCAACAACCAGCTGGTGACCAAAGGAGTCACAGTCTGAATCTACCAACAGGGTTCG  
ACAAACCATACGTCCGCCTAGAGGACGAGACACCCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACG  
GGGCCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAACTGCACCGCGGAGGTACGAGATCGACCTC  
CCATCCCAACGCCTACCCCCGTTACTGCGACAGGAGCCCTCACCCTCTCTACGAG  
GAAACGCCGACATCGTCAACTCCACGACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTG  
GCAGAACAACCCGCAGTCGAGACCAAGTTCGACTTCCAGCTGGACTTCATGGGCCTT  
GACAACGACGTCCCAGTTGTACAGTGGTCAGCTCCGTGCTGGCCACAAATGACAAC  
TACAGAGGAGTCTCAGCCAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGAGAACATCACAAAG  
CCGATCACCAGGGTCAAGCTGTCATAAAGCTCAACCAGCAGACAGCAATCGGCAAC  
GTCGCCACCCTGGGCACAATGGGCCCAGCATCCGTCTCCTTCTCATCAGGGAACGG  
GAATGTCCCCGGCGTGCTCAGACCAATCACACTGGTGGCCTATGAGAAGATGACACC  
GCTGTCCATCCTGACCGTAGCTGGAGTGTCCAACACTACGAGCTGATCCCAAACCCAGA  
ACTCCTAAAGAACATGGTAACACGCTATGGCAAGTACGACCCCGAAGGTCTCAACTAT  
GCCAAGATGATCCTGTCCCACAGGGAAGAGCTGGACATCAGGACAGTGTGGAGGAC  
AGAGGAGTACAAGGAGAGGACCAGAGTCTTCAACGAAATCACGGACTTCTCCAGTGA  
CCTGCCACAGTCAAAGGCATGGGGCTGGAGAGACATAGTCAGAGGAATTCGGAAAG  
TCGCAGCTCCTGTACTGTCCACGCTGTTTCCAATGGCAGCACCACTCATAGGAATGG  
CAGACCAATTCATTGGAGATCTCACCAAGACCAACGCAGCAGGCGGAAGGTACCACT  
CCATGGCCGCAGGAGGGCGCCACAAAGACGTGCTCGAGTCCCTGGGCAAGCGGAGG  
GCCCGACGGAAAATTCTCCCGAGCCCTCAAGAACAGGCTGGAGTCCGCCAACTACG  
AGGAAGTCGAGCTTCCACCCCCCTCAAAGGGAGTCATCGTCCCTGTGGTGCACACAG

TCAAGAGTGCACCAGGCGAGGCATTCGGGTCCCTGGCAATCATAATTCCAGGGGAGT  
ACCCCGAGCTTCTAGATGCCAACCAGCAGGTCCTATCCCCTTCGCAAACGACACCG  
GGAGCGTGTGGGGCATAGGAGAGGACATACCCTTCGAGGGAGACAACATGTGCTAC  
ACTGCACTCCCCTCAAGGAGATCAAAAGAAACGGGAACATAGTAGTCGAGAAGATC  
TTTGCTGGACCAATCATGGGTCCCTCCGCTCAACTAGGACTGTCCCTACTTGTGAAC  
GACATCGAGGACGGAGTTCCAAGGATGGTATTCACCGGCGAAATCGCCGATGACGA  
GGAGACAATCATACCAATCTGCGGTGTAGACATCAAAGCCATCGCAGCCCATGAGCA  
AGGGCTGCCACTCATCGGCAACCAACCAGGAGTGGACGAGGAGGTGCGAAACACAT  
CCCTGGCCGCACACCTGATCCAGACCGGAACCCTGCCCGTACAACGCGCAAAGGGC  
TCCAACAAGAGGATCAAGTACCTGGGAGAGCTGATGGCATCAAATGCATCCGGGATG  
GACGAGGAACTGCAACGCCTCCTGAACGCCACAATGGCACGGGCCAAAGAAGTCCA  
GGACGCCGAGATCTACAACTTCTCAAGCTCATGGCATGGACCAGAAAGAACGACCT  
CACCGACCACATGTACGAGTGGTCAAAAGAGGACCCCAATGCACTAAAGTTCGGAAA  
GCTCGTCAGCACGCCACCAAAGCACCCCGAGAAGCCCAAAGGACCAGACCAACACC  
ACGCCCAAGAGGCGAGAGCCACCCGCATATCACTGGACGCCGTGAGAGCCGGGGC  
GGACTTCGCCACACCGGAATGGGTCCGCGCTGAACAACCTACCGCGGCCCATCTCCCG  
GGCAGTTCAAGTACTACCTGATCACTGGACGAGAACCAGAACCAGGCGACGAGTACG  
AGGACTACATAAAACAACCCATTGTGAAACCGACCGACATGAACAAAATCAGACGTCT  
AGCCAACAGTGTGTACGGCCTCCCACACCAGGAACCAGCACCAGAGGAGTTCTACG  
ATGCAGTTGCAGCTGTATTCGCACAGAACGGAGGCAGAGGTCCCGACCAGGACCAA  
ATGCAAGACCTCAGGGAGCTCGCAAGACAGATGAAACGACGACCCCGGAACGCCGA  
TGCACCACGGAGAACCAGAGCGCCAGCGGAACCGGCACCGCCCGGACGCTCAAGG  
TTCACCCCCAGCGGAGATAACGCTGAGGTGTAACGACTACTCTCTTCTGACTGAT

## Muestra CGPC1. Segmento B

AAACAGTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATACCACGACTGTTTATGTATGCACG  
CGAGTGCCCCCTTTTAAAACCTCTACAATATACTTATGATATGTTCGGACATCTTCAA  
TTCACCTCAGAACAAGGCTTCTATCTTGAATGCACTCATGAAGAGCACGCAGGGAGA  
CGTGGAGGATGTTCTAATACCCAAGCGGTTTCAGACCCGCAAAGGATCCGTTAGATAG  
CCCCAGGCTGCAGCCGCGTTCCTGAAAGAACAAGTATCGGATACTTAGGCCGC  
GAGCCATACCCACCATGGTTGAAATAGAGACGGATGCCGCTCTGCCTCGACTAGCGG  
CCATGGTGGATGATGGCAAGCTTAAGGAAATGGTCAATGTTCCCGAAGGAACAACCG  
CGTTCTACCCAAAATACTACCCATTCCACAAACCCGACCATGACGACGTGGGAACGTT  
TGGGGCTCCAGACATAACACTACTCAAACAACCTGACGTTCTTCCCTGCTGGAGAATGAC  
TTTCCAACCTGGTCCAGAAACCCTAAGACAAGTCAGAGAAGCAATCGCAACCCTGCAAT  
ACGGGTCCGGCAGCTACTCAGGACAACCTCAACAGGCTACTGGCAATGAAGGGCGTC  
GCCACGGGGAGGAATCCCAACAAGACTCCACTGGCCGTTGGCTATACCAACGAGCA  
GATGGCAAGACTGATGGAGCAAACCTTGCCTATCAACCCTCCAAAGAATGAGGACCC  
AGACCTCCGATGGGCCCAAGCTGGTTGATACAGTACACCGGAGACGCATCAACTGA  
CAAGTCATATCTCCCTCATGTGACAGTCAAGTCATCTGCCGGCCTACCCTACATAGGC  
AAAACCAAAGGAGACACCACGGCCGAAGCCCTGGTGCTGGCAGACTCCTTCATAAG  
GGACCTCGGAAAAGCCGCAACATCAGCCGACCCAGAGGCGGACGTCAAGAAAGTAC  
TGTCCGACTTCTGGTACCTCAGCTGCGGTCTGCTCTTCCAAAAGGGGAGAGATACA  
CACAGAAAGACTGGGACTTGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCCCCCTATCCAACGC  
ACCTACTACTATCAATGGTGTGTCGTCACCGGTGATGGATGAGTCAAACTCAACATCAC  
CAACTCAGACCCCTTCTCTGTATGGGTTCTCACCATTCCACGGTGGGATCAACAGA  
ATCATGACCATCATCAGAGAGCATCTAGATCAAGAGCAGGACCTAGTCATGATATATG  
CCGACAACATATACTACTACAGGACAACACCTGGTACTCCATCGATCTAGAAAAGGG  
AGAAGCAAACCTGCACACCACAACACATGCAGGCAATGATGTACTACCTGCTCACACG  
CGGATGGACAAACGAGGACGGCTCACCACGATACAACCCGACGTGGGCAACATTCG  
CCATGAACGTTGGGCCCTCAATGGTAGTGGACTCAACCTGCCTGCTGATGAATCTGC  
AGCTGAAGACCTACGGGCAAGGCAGTGGGAACGCCTTCACCTTCCCTCAACAACCATC  
TCATGTCCACAATTGTGGTCGCGGAGTGGCACAAGGCAGGAAGGCCAAATCCCATGT  
CCAAAGAATTCATGGACCTCGAAGCAAAGACGGGGATCAACTTCAAATCGAGCGCG  
AGCTAAAAGACCTAAGGTGATCATCATGGAGGCGGTAGACACCCGCCCACTCGACG  
GCTATCTAGCCGACGGATCCGACCTGCCACCCAGGGTGCCAGGGAAGGCGGTGGA

GCTCGACCTTCTAGGATGGTCCGCAGTGTACAGCCGACAACCTCGAGATGTTTCGTCCC  
CGTCCTTGAAAACGAAAGACTAATTGCATCAGTCGCCTACCCAAAAGGGCTAGAGAA  
CAAATCCCTAGCTCGAAAACCCGGGGCCGAGATCGCATACCAAATAGTAAGGTATGA  
AGCAATTTCGGCTCATCGGAGGCTGGAACAATCCACTCATCGAAACGGCAGCAAAACA  
CATGTCCCTGGACAAAAGGAAGAGACTGGAGGTAAGGCATCGACGTCACCGGATT  
CCTAGACGACTGGAACACCATGTTCGGAGTTCGGAGGCGATCTGGAGGGCATCTCAC  
TAACAGCTCCCCTCACAAACCAGACTCTCCTAGACATCAACACGCCAGAGACCGAGT  
TCGACGTCAAAGACAGACCCCCACGCCGCGTTCGCCAGGCAAACCCCTCGCCGAG  
GTAACCGCAGCGATAACATCAGGGACCTACAAAGACCCCAAAGTGCAGTGTGGAGG  
CTCCTCGACCAGAGAACCAAACACTACGCGTGAGCACCCCTACGTGATCAGGCGCACGC  
GCTAAAACCCGCAGCGTCAACATCCGACAACCTGGGGGGACGCCACAGAAGAAGTCCG  
CCGAACAACAACAGCTGCTGATGAAGGCAAACAACCTGCTAAAGAGCAGCCTCACGG  
AAGCGAGGGAAGCCCTCGAAACCGTGCAGTCAGACAAAATAATCTCAGGCAAACCT  
CTCCAGAGAAGAATCCCGGGACCGCCGCAAACCCCGTGGTTGGCTATGGAGAATTC  
AGCGAGAAAATTCTCTCACTCCCACGCAAAGAAGAACGCCAAGCGTCGGGAGAAG  
CAGAGAAGAACTAAGAACGAAGACCAGGGAGCATCCGAAATGAAATGGATGGACTC  
ACAAGAGCTCCGCGCCAGAAGGCAATCCAGACCAAAGTAGTGACCTGAGACAGTGC  
CACCAACATGACCCCTGAA

## Muestra CGPC5. Segmento A

GAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAGGAGC  
TCTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAACAAACAAACAATCTATATCAATGCA  
AGATGAACACAAACAAGGCAACCGCAACTTACCTGAAATCCATTATGCTTCCAGAGAC  
TGGACCAGCAAGCATCCCGGACGACATAACGGAGAGACACATCCTAAAACAAGAGAC  
CTCGTCATAACAACCTAGAGGTCTCCGAATCAGGAAGTGGCATTCTTGTTTGTTCCT  
GGGGCACCAGGCTCACGGATCGGTGCACACTACAGATGGAATGCGAACCAGACGGG  
GCTGGAGTTCGACCAGTGGCTGGAGACGTGCGCAGGACCTGAAGAAAGCCTTCAACT  
ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGACATCCAAAGCTCCACACTACCGGCCGGTC  
TCTATGCTCTGAACGGGACGCTCAACGCTGCCACCTTCGAAGGCAGTCTGTCTGAGG  
TGGAGAGCCTGACCTACAACAGCCTGATGTCCCTAACAAACGAACCCCCAGGACAAAG  
TCAACAACCAGCTGGTGACCAAAGGAGTCACAGTCTGAATCTACCAACAGGGTTCG  
ACAAACCATACGTCCGCCTAGAGGACGAGACACCCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACG  
GGGCCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAACTGCACCGCGGAGGTACGAGATCGACCTC  
CCATCCCAACGCCTACCCCCGTTACTGCGACAGGAGCCCTCACCCTCTCTACGAG  
GAAACGCCGACATCGTCAACTCCACGACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTG  
GCAGAACAACCCGCAGTCGAGACCAAGTTCGACTTCCAGCTGGACTTCATGGGCCTT  
GACAACGACGTCCCAGTTGTACAGTGGTCAGCTCCGTGCTGGCCACAAATGACAAC  
TACAGAGGAGTCTCAGCCAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGAGAACATCACAAAG  
CCGATCACCAGGGTCAAGCTGTCATAAAGCTCAACCAGCAGACAGCAATCGGCAAC  
GTCGCCACCCTGGGCACAATGGGCCCAGCATCCGTCTCCTTCTCATCAGGGAACGG  
GAATGTCCCCGGCGTGCTCAGACCAATCACACTGGTGGCCTATGAGAAGATGACACC  
GCTGTCCATCCTGACCGTAGCTGGAGTGTCCAACACTACGAGCTGATCCCAAACCCAGA  
ACTCCTAAAGAACATGGTAACACGCTATGGCAAGTACGACCCCGAAGGTCTCAACTAT  
GCCAAGATGATCCTGTCCCACAGGGAAGAGCTGGACATCAGGACAGTGTGGAGGAC  
AGAGGAGTACAAGGAGAGGACCAGAGTCTTCAACGAAATCACGGACTTCTCCAGTGA  
CCTGCCACGTCAAAGGCATGGGGCTGGAGAGACATAGTCAGAGGAATTCGGAAAG  
TCGCAGCTCCTGTACTGTCCACGCTGTTTCCAATGGCAGCACCACTCATAGGAATGG  
CAGACCAATTCATTGGAGATCTACCAAGACCAACGCAGCAGGCGGAAGGTACCACT  
CCATGGCCGCAGGAGGGCGCCACAAAGACGTGCTCGAGTCCCTGGGCAAGCGGAGG  
GCCCGACGGAAAATTCTCCCGAGCCCTCAAGAACAGGCTGGAGTCCGCCAACTACG  
AGGAAGTCGAGCTTCCACCCCCCTCAAAGGAGTCATCGTCCCTGTGGTGCACACAG

TCAAGAGTGCACCAGGCGAGGCATTCGGGTCCCTGGCAATCATAATTCCAGGGGAGT  
ACCCCGAGCTTCTAGATGCCAACCAGCAGGTCCTATCCCCTTCGCAAACGACACCG  
GGAGCGTGTGGGGCATAGGAGAGGACATACCCTTCGAGGGAGACAACATGTGCTAC  
ACTGCACTCCCCTCAAGGAGATCAAAAGAAACGGGAACATAGTAGTCGAGAAGATC  
TTTGCTGGACCAATCATGGGTCCCTCCGCTCAACTAGGACTGTCCCTACTTGTGAAC  
GACATCGAGGACGGAGTTCCAAGGATGGTATTCACCGGCGAAATCGCCGATGACGA  
GGAGACAATCATACCAATCTGCGGTGTAGACATCAAAGCCATCGCAGCCCATGAGCA  
AGGGCTGCCACTCATCGGCAACCAACCAGGAGTGGACGAGGAGGTGCGAAACACAT  
CCCTGGCCGCACACCTGATCCAGACCGGAACCCTGCCCGTACAACGCGCAAAGGGC  
TCCAACAAGAGGATCAAGTACCTGGGAGAGCTGATGGCATCAAATGCATCCGGGATG  
GACGAGGAACTGCAACGCCTCCTGAACGCCACAATGGCACGGGCCAAAGAAGTCCA  
GGACGCCGAGATCTACAACTTCTCAAGCTCATGGCATGGACCAGAAAGAACGACCT  
CACCGACCACATGTACGAGTGGTCAAAAGAGGACCCCAATGCACTAAAGTTCGGAAA  
GCTCGTCAGCACGCCACCAAAGCACCCCGAGAAGCCCAAAGGACCAGACCAACACC  
ACGCCCAAGAGGCGAGAGCCACCCGCATATCACTGGACGCCGTGAGAGCCGGGGC  
GGACTTCGCCACACCGGAATGGGTCCGCGCTGAACAACCTACCGCGGCCCATCTCCCG  
GGCAGTTCAAGTACTACCTGATCACTGGACGAGAACCAGAACCAGGCGACGAGTACG  
AGGACTACATAAAACAACCCATTGTGAAACCGACCGACATGAACAAAATCAGACGTCT  
AGCCAACAGTGTGTACGGCCTCCCACACCAGGAACCAGCACCAGAGGAGTTCTACG  
ATGCAGTTGCAGCTGTATTCGCACAGAACGGAGGCAGAGGTCCCGACCAGGACCAA  
ATGCAAGACCTCAGGGAGCTCGCAAGACAGATGAAACGACGACCCCGGAACGCCGA  
TGCACCACGGAGAACCAGAGCGCCAGCGGAACCGGCACCGCCCGGACGCTCAAGG  
TTCACCCCCAGCGGAGATAACGCTGAGGTGTAACGACTACTCTCTTTCCTGACTG

## Muestra CGPC5. Segmento B

GAAACAGTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATACCACGACTGTTTATGTATGCAC  
GCGAGTGGCCCCTTTTAAAACCTCTACAATATACAACTTATGATATGTCCGACATCTTC  
AATCACCTCAGAACAAGGCTTCTATCTTGAATGCACTCATGAAGAGCACGCAGGGA  
GACGTGGAGGATGTTCTAATACCCAAGCGTTTCAGACCCGCAAAGGATCCGTTAGAT  
AGCCCCAGGCTGCAGCCGCGTTCCTGAAAGAACAAGTATCGGATACTTAGGCCG  
CGAGCCATACCCACCATGGTTGAAATAGAGACGGATGCCGCTCTGCCTCGACTAGCG  
GCCATGGTGGATGATGGCAAGCTTAAGGAAATGGTCAATGTTCCCGAAGGAACAACC  
GCGTTCTACCCAAAATACTACCCATTCCACAAACCCGACCATGACGACGTGGGAACG  
TTTGGGGCTCCAGACATAAATACTACTCAAACAACCTGACGTTCTTCTGCTGGAGAATG  
ACTTTCCAACCTGGTCCAGAAACCCTAAGACAAGTCAGAGAAGCAATCGCAACCCTGC  
AATACGGGTCCGGCAGCTACTCAGGACAACCTCAACAGGCTACTGGCAATGAAGGGC  
GTCCGACGGGGAGGAATCCCAACAAGACTCCACTGGCCGTTGGCTATACCAACGA  
GCAGATGGCAAGACTGATGGAGCAAACCTTGCCTATCAACCCTCCAAAGAATGAGGA  
CCCAGACCTCCGATGGGCCCAAGCTGGTTGATACAGTACACCGGAGACGCATCAA  
CTGACAAGTCATATCTCCCTCATGTGACAGTCAAGTCATCTGCCGGCCTACCCTACAT  
AGGCAAACCAAAGGAGACACCACGGCCGAAGCCCTGGTGCTGGCAGACTCCTTCA  
TAAGGGACCTCGGAAAAGCCGCAACATCAGCCGACCCAGAGGCGGACGTCAAGAAA  
GTACTGTCCGACTTCTGGTACCTCAGCTGCGGTCTGCTCTTCCCAAAGGGGAGAGA  
TACACACAGAAAGACTGGGACTTGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCCCCCTATCCA  
ACGCACCTACTACTATCAATGGTGTGTCGTCACCGGTGATGGATGAGTCAAACTCAACA  
TCACCAACACTCAGACCCCTTCTCTGTATGGGTTCTCACCATTCCACGGTGGGATCAA  
CAGAATCATGACCATCATCAGAGAGCATCTAGATCAAGAGCAGGACCTAGTCATGATA  
TATGCCGACAACATATACTACTACAGGACAACACCTGGTACTCCATCGATCTAGAAA  
AGGGAGAAGCAAACCTGCACACCACAACACATGCAGGCAATGATGTACTACCTGCTCA  
CACGCGGATGGACAAACGAGGACGGCTCACCACGATAACAACCCGACGTGGGCAACA  
TTCGCCATGAACGTTGGGCCCTCAATGGTAGTGGACTCAACCTGCCTGCTGATGAAT  
CTGCAGCTGAAGACCTACGGGCAAGGCAGTGGGAACGCCTTACCTTCTCAACAAC  
CATCTCATGTCCACAATTGTGGTCCGAGTGGCACAAGGCAGGAAGGCCAAATCCC  
ATGTCAAAGAATTCATGGACCTCGAAGCAAAGACGGGGATCAACTTCAAATCGAG  
CGCGAGCTAAAAGACCTAAGGTGATCATCATGGAGGCGGTAGACACCGCCCCACT  
CGACGGCTATCTAGCCGACGGATCCGACCTGCCACCCAGGGTGCCAGGGAAGGCG

GTGGAGCTCGACCTTCTAGGATGGTCCGCAGTGTACAGCCGACAACCTCGAGATGTTC  
GTCCCCGTCCCTTGAAAACGAAAGACTAATTGCATCAGTCGCCTACCCAAAAGGGCTA  
GAGAACAAATCCCTAGCTCGAAAACCCGGGGCCGAGATCGCATACCAAATAGTAAGG  
TATGAAGCAATTTCGGCTCATCGGAGGCTGGAACAATCCACTCATCGAAACGGCAGCA  
AAACACATGTCCCTGGACAAAAGGAAGAGACTGGAGGTAAAAGGCATCGACGTCACC  
GGATTCCTAGACGACTGGAACACCATGTTCGGAGTTCGGAGGCGATCTGGAGGGCAT  
CTCACTAACAGCTCCCCTCACAAACCAGACTCTCCTAGACATCAACACGCCAGAGAC  
CGAGTTCGACGTCAAAGACAGACCCCCACGCCGCGTTCCCCAGGCCAAAACCCTCG  
CCGAGGTAACCGCAGCGATAACATCAGGGACCTACAAAGACCCCAAAAGTGCAAGTGT  
GGAGGCTCCTCGACCAGAGAACCAAACTACGCGTGAGCACCTACGTGATCAGGCG  
CACGCGCTAAAACCCGCAGCGTCAACATCCGACAACCTGGGGGGACGCCACAGAAGA  
ACTCGCCGAACAACAACAGCTGCTGATGAAGGCAAACAACCTGCTAAAGAGCAGCCT  
CACGGAAGCGAGGGGAAGCCCTCGAAACCGTGCAAGTCAGACAAAATAATCTCAGGCAA  
AACCTCTCCAGAGAAGAATCCCGGGACCGCCGCAAACCCCGTGGTTGGCTATGGAG  
AATTCAGCGAGAAAATTCCTCTCACTCCCACGCAAAGAAGAACGCCAAGCGTCGGG  
AGAAGCAGAGAAGAACTAAGAACGAAGACCAGGGAGCATCCGAAATGAAATGGATG  
GACTCACAAGAGCTCCGCGCCAGAAGGCAATCCAGACCAAAGTAGTGACCTGAGACA  
GTGCCACCAACATGACCCCTGAAA

## Muestra CNJJ2. Segmento A

GAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAGGAGC  
TCTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAACAAACAAACAATCTATATCAATGCA  
AGATGAACACAAACAAGGCAACCGCAACTTACCTGAAATCCATTATGCTTCCAGAGAC  
TGGACCAGCAAGCATCCCGGACGACATAACGGAGAGACACATCCTAAAACAAGAGAC  
CTCGTCATAACAACCTAGAGGTCTCCGAATCAGGAAGTGGCATTCTTGTTTGTTCCT  
GGGGCACCAGGCTCACGGATCGGTGCACACTACAGATGGAATGCGAACCAGACGGG  
GCTGGAGTTCGACCAGTGGCTGGAGACGTGCGCAGGACCTGAAGAAAGCCTTCAACT  
ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGACATCCAAAGCTCCACACTACCGGCCGGTC  
TCTATGCTCTGAACGGGACGCTCAACGCTGCCACCTTCGAAGGCAGTCTGTCTGAGG  
TGGAGAGCCTGACCTACAACAGCCTGATGTCCCTAACAAACGAACCCCCAGGACAAAG  
TCAACAACCAGCTGGTGACCAAAGGAGTCACAGTCTGAATCTACCAACAGGGTTCG  
ACAAACCATACGTCCGCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACG  
GGGCCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAACTGCACCGCGGAGGTACGAGATCGACCTC  
CCATCCCAACGCCTACCCCCGTTACTGCGACAGGAGCCCTCACCCTCTCTACGAG  
GAAACGCCGACATCGTCAACTCCACGACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTG  
GCAGAACAACCCGCAGTCGAGACCAAGTTCGACTTCCAGCTGGACTTCATGGGCCTT  
GACAACGACGTCCCAGTTGTACAGTGGTCAGCTCCGTGCTGGCCACAAATGACAAC  
TACAGAGGAGTCTCAGCCAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGAGAACATCACAAAG  
CCGATCACCAGGGTCAAGCTGTCATAAAGCTCAACCAGCAGACAGCAATCGGCAAC  
GTCGCCACCCTGGGCACAATGGGCCCAGCATCCGTCTCCTTCTCATCAGGGAACGG  
GAATGTCCCCGGCGTGCTCAGACCAATCACACTGGTGGCCTATGAGAAGATGACACC  
GCTGTCCATCCTGACCGTAGCTGGAGTGTCCAACACTACGAGCTGATCCCAAACCCAGA  
ACTCCTAAAGAACATGGTAACACGCTATGGCAAGTACGACCCCGAAGGTCTCAACTAT  
GCCAAGATGATCCTGTCCCACAGGGAAGAGCTGGACATCAGGACAGTGTGGAGGAC  
AGAGGAGTACAAGGAGAGGACCAGAGTCTTCAACGAAATCACGGACTTCTCCAGTGA  
CCTGCCACAGTCAAAGGCATGGGGCTGGAGAGACATAGTCAGAGGAATTCGGAAAG  
TCGCAGCTCCTGTACTGTCCACGCTGTTTCCAATGGCAGCACCACTCATAGGAATGG  
CAGACCAATTCATTGGAGATCTACCAAGACCAACGCAGCAGGCGGAAGGTACCACT  
CCATGGCCGCAGGAGGGCGCCACAAAGACGTGCTCGAGTCCCTGGGCAAGCGGAGG  
GCCCGACGGAAAATTCTCCCGAGCCCTCAAGAACAGGCTGGAGTCCGCCAACTACG  
AGGAAGTCGAGCTTCCACCCCCCTCAAAGGAGTCATCGTCCCTGTGGTGCACACAG

TCAAGAGTGCACCAGGCGAGGCATTCGGGTCCCTGGCAATCATAATTCCAGGGGAGT  
ACCCCGAGCTTCTAGATGCCAACCAGCAGGTCCTATCCCCTTCGCAAACGACACCG  
GGAGCGTGTGGGGCATAGGAGAGGACATACCCTTCGAGGGAGACAACATGTGCTAC  
ACTGCACTCCCCTCAAGGAGATCAAAAGAAACGGGAACATAGTAGTCGAGAAGATC  
TTTGCTGGACCAATCATGGGTCCCTCCGCTCAACTAGGACTGTCCCTACTTGTGAAC  
GACATCGAGGACGGAGTTCCAAGGATGGTATTCACCGGCGAAATCGCCGATGACGA  
GGAGACAATCATACCAATCTGCGGTGTAGACATCAAAGCCATCGCAGCCCATGAGCA  
AGGGCTGCCACTCATCGGCAACCAACCAGGAGTGGACGAGGAGGTGCGAAACACAT  
CCCTGGCCGCACACCTGATCCAGACCGGAACCCTGCCCGTACAACGCGCAAAGGGC  
TCCAACAAGAGGATCAAGTACCTGGGAGAGCTGATGGCATCAAATGCATCCGGGATG  
GACGAGGAACTGCAACGCCTCCTGAACGCCACAATGGCACGGGCCAAAGAAGTCCA  
GGACGCCGAGATCTACAACTTCTCAAGCTCATGGCATGGACCAGAAAGAACGACCT  
CACCGACCACATGTACGAGTGGTCAAAAGAGGACCCCAATGCACTAAAGTTCGGAAA  
GCTCGTCAGCACGCCACCAAAGCACCCCGAGAAGCCCAAAGGACCAGACCAACACC  
ACGCCCAAGAGGCGAGAGCCACCCGCATATCACTGGACGCCGTGAGAGCCGGGGC  
GGACTTCGCCACACCGGAATGGGTCCGCGCTGAACAACCTACCGCGGCCCATCTCCCG  
GGCAGTTCAAGTACTACCTGATCACTGGACGAGAACCAGAACCAGGCGACGAGTACG  
AGGACTACATAAAACAACCCATTGTGAAACCGACCGACATGAACAAAATCAGACGTCT  
AGCCAACAGTGTGTACGGCCTCCCACACCAGGAACCAGCACCAGAGGAGTTCTACG  
ATGCAGTTGCAGCTGTATTCGCACAGAACGGAGGCAGAGGTCCCGACCAGGACCAA  
ATGCAAGACCTCAGGGAGCTCGCAAGACAGATGAAACGACGACCCCGGAACGCCGA  
TGCACCACGGAGAACCAGAGCGCCAGCGGAACCGGCACCGCCCGGACGCTCAAGG  
TTCACCCCCAGCGGAGATAACGCTGAGGTGTAACGACTACTCTCTTTCCTGACTG

**Muestra CNJJ2. Segmento B**

GGAAACAGTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATACCACGACTGTTTATGTATGCA  
CGCGAGTGCCCCTTTTAAACCTCTACAATATACAACTTATGATATGTCGGACATCTTC  
AATCACCTCAGAACAAGGCTTCTATCTTGAATGCACTCATGAAGAGCACGCAGGGA  
GACGTGGAGGATGTTCTAATACCCAAGCGTTTCAGACCCGCAAAGGATCCGTTAGAT  
AGCCCCAGGCTGCAGCCGCGTTCCTGAAAGAACAAGTATCGGATACTTAGGCCG  
CGAGCCATACCCACCATGGTTGAAATAGAGACGGATGCCGCTCTGCCTCGACTAGCG  
GCCATGGTGGATGATGGCAAGCTTAAGGAAATGGTCAATGTTCCCGAAGGAACAACC  
GCGTTCTACCCAAAATACTACCCATTCCACAAACCCGACCATGACGACGTGGGAACG  
TTTGGGGCTCCAGACATAAACTACTCAAACAACCTGACGTTCTTCTGCTGGAGAATG  
ACTTTCCAACCTGGTCCAGAAACCCTAAGACAAGTCAGAGAAGCAATCGCAACCCTGC  
AATACGGGTCCGGCAGCTACTCAGGACAACCTCAACAGGCTACTGGCAATGAAGGGC  
GTCCGACGGGGAGGAATCCCAACAAGACTCCACTGGCCGTTGGCTACACCAACGA  
GCAGATGGCAAGACTGATGGAGCAAACCTTGCCTATCAACCCTCCAAAGAATGAGGA  
CCCAGACCTCCGATGGGCCCAAGCTGGTTGATACAGTACACCGGAGACGCATCAA  
CTGACAAGTCATATCTCCCTCATGTGACAGTCAAGTCATCTGCCGGCCTACCCTACAT  
AGGCAAACCAAAGGAGACACCACGGCCGAAGCCCTGGTGCTGGCAGACTCCTTCA  
TAAGGGACCTCGGAAAAGCCGCAACATCAGCCGACCCAGAGGCGGACGTCAAGAAA  
GTACTGTCCGACTTCTGGTACCTCAGCTGCGGTCTGCTCTTCCCAAAGGGGAGAGA  
TACACACAGAAAGACTGGGACTTGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCCCCCTATCCA  
ACGCACCTACTACTATCAATGGTGTGTCGTCACCGGTGATGGATGAGTCAAACTCAACA  
TCACCAACACTCAGACCCCTCCTCTGTACGGGTTCTCACCATTCCACGGTGGGATCA  
ACAGAATCATGACCATCATCAGAGAGCATCTAGATCAAGAGCAGGACCTAGTCATGAT  
ATATGCCGACAACATATACTACTACAGGACAACACCTGGTACTCCATCGATCTAGAA  
AAGGGAGAAGCAAACCTGCACACCACAACACATGCAGGCAATGATGTACTACCTGCTC  
ACACGCGGATGGACAAACGAGGACGGCTCACCACGATACAACCCGACGTGGGCAAC  
ATTCGCCATGAACGTTGGGCCCTCAATGGTAGTGGACTCAACCTGCCTGCTGATGAA  
TCTGCAGCTGAAGACCCACGGGCAAGGCAGTGGGAACGCCTTACCTTCTCAACAA  
CCATCTCATGTCCACAATTGTGGTCGCGGAGTGGCACAAGGCAGGAAGGCCAAGTC  
CCATGTCCAGGGAATTCATGGACCTCGAGGCAAAGACGGGGATCAACTTCAAATCG  
AGCGCGAGCTAAAAGACCTAAGGTGATCATCATGGAGGCGGTAGACACCGCCCCA  
CTCGACGGCTATCTAGCCGACGGGTCCGACCTGCCACCCAGGGTGCCAGGGAAGGC

GGTGGAGCTCGACCTTCTAGGATGGTCCGCAGTGTACAGCCGACAACCTCGAGATGTT  
CGTCCCCGTCTTGAAAACGAAAGACTAATTGCATCAGTCGCCTACCCAAAAGGGCT  
AGAGAACAAATCCCTAGCTCGAAAACCCGGGGCCGAGATCGCATAACCAATAGTAAG  
GTACGAAGCGATTTCGGCTCATCGGAGGCTGGAACAATCCACTCATCGAAACGGCAGC  
AAAACACATGTCCCTGGACAAAAGGAAGAGACTGGAGGTAAAAGGCATCGACGTCAC  
CGGATTCTAGACGACTGGAACACCATGTCCGGAGTTCGGAGGCGATCTGGAGGGCA  
TCTACTAACAGCTCCCCTCACAAACCAGACTCTCCTAGACATCAACACGCCAGAGAC  
CGAGTTCGACGTCAAAGACAGACCCCCACGCCGCGTTCCCAGGCCAAAACCCTCG  
CCGAGGTAACCGCAGCGATAACATCAGGGACCTACAAAGACCCCAAAAGTGCAGTGT  
GGAGGCTCCTCGACCAGAGAACCAAACCTACGCGTGAGCACCTACGCGATCAGGCG  
CACGCGCTAAAACCCGCGGCGTCAACATCCGACAACCTGGGGGGACGCCACAGAAGA  
ACTCGCCGAACAACAACAGCTGCTGATGAAGGCAAACAACCTGCTAAAGAGCAGCCT  
CACGGAAGCGAGGGAAGCCCTCGAAACCGTGCAGTCAGACAAAATAATCTCAGGCAA  
AACCTCTCCAGAGAAGAATCCCGGGACCGCCGCAAACCCCGTGGTTGGCTATGGAG  
AATTCAGCGAGAAAATTCTCTACTCCCACGCAAAGAAGAACGCCAAGCGTCGGG  
AGAAGCAGAGAAGAACTAAGAACGAAGACCAGGGAGCATCCGAAATGAAATGGATG  
GACTCACAAGAGCTCCGCGCCAGAAGGCAATCCAGACCAAAGTAGTGACCTGAGACA  
GTGCCACCAACATGACCCCTGAA

## Muestra EBPS1. Segmento A

GGAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAGGA  
GCTCTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAACAAACAAACAATCTATATCAATG  
CAAGATGAACACAAACAAGGCAACCGCAACTTACCTGAAATCCATTATGCTTCCAGAG  
ACTGGACCAGCAAGCATCCCGGACGACATAACGGAGAGACACATCCTAAAACAAGAG  
ACCTCGTCATAAACCTAGAGGTCTCCGAATCAGGAAGTGGCATTCTTGTTTGTTC  
CTGGGGCACCAGGCTCACGGATCGGTGCACACTACAGATGGAATGCGAACCAGACG  
GGGCTGGAGTTCGACCAGTGGCTGGAGACGTGCGCAGGACCTGAAGAAAGCCTTCAA  
CTACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGACATCCAAAGCTCCACACTACCGGCCGG  
TCTCTATGCTCTGAACGGGACGCTCAACGCTGCCACCTTCGAAGGCAGCCTGTCTGA  
GGTGGAGAGCCTGACCTACAACAGCCTGATGTCCCTAACAAACGAACCCCCAGGACAA  
AGTCAACAACCAGCTGGTGACCAAAGGAGTACAGTCCTGAATCTACCAACAGGGTT  
CGACAAACCATACGTCCGCCTAGAGGACGAGACACCCCAGGGTCTCCAGTCAATGAA  
CGGGGCCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAACTGCACCGCGGAGGTACGAGATCGACC  
TCCCATCCCAACGCCTACCCCCGTCGCTGCGACAGGAACCCTCACCACCCTCTATG  
AGGGAAACGCTGACATCGTCAACTCCACGACAGTGGCGGGAGACATAAACTTCAGTC  
TGACAGACCAACCCGCAGTCGAGACCAAGTTCGACTTCCAGCTGGACTTCATGGGCC  
TTGACAACGACGTCCCAGTTGTCACAGTGGTCAGCTCCGTGCTGGCCACAGACGACA  
ACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGAGAACATCACAA  
AGCCGATCACCAGGGTCAAGCTGTCATAAAGCTCAACCAGCAGACAGCAATCGGCA  
ACGTGCCACCCTGGGCACAATGGGTCCAGCATCCGTCTCCTTCTCATCAGGGAACG  
GGAATGTCCCCGGCGTGCTCAGACCAATCACACTGGTGGCCTATGAGAAGATGACAC  
CGCTGTCCATCCTGACCGTAGCTGGAGTGTCCAACACTACGAGCTGATCCCAAACCCAG  
AACTCCTAAAGAACATGGTAACACGCTATGGCAAGTACGACCCCGAAGGTCTCAACT  
ATGCCAAGATGATCCTGTCCCACAGGGAGGAGCTGGACATCAGGACAGTGTGGAAG  
ACAGAGGAGTACAAGGAGAGGACCAGAGTCTTCAACGAAATCACGGACTTCTCCAGT  
GACCTGCCACGTCAAAGGCATGGGGCTGGAGAGACATAGTCAGAGGAATTCCGAA  
AGTCGCAGCTCCTGTACTGTCCACGCTGTTTCCAATGGCAGCACCCTCATAGGAAT  
GGCAGACCAATTCATTGGAGATCTCACCAAGACCAACGCAGCAGGCGGAAGGTACCA  
CTCCATGGCCGCAGGAGGGCGCTACAAAGACGTGCTCGAGTCTGGGCAAGCGGAG  
GGCCCGACGGGAAATTCTCCCGAGCCCTCAAGAACAGGCTGGAGTCCGCCAACTAT  
GAGGAAGTCGAGCTTCCACCCCCCTCAAAGGAGTCATCGTCCCTGTGGTGCACACA

GTCAAGAGTGCACCAGGCGAGGCATTTCGGGTCCCTGGCAATCATAATTCCAGGGGA  
GTACCCCGAGCTTCTAGATGCCAACCAGCAGGTCTATCCCCTTCGCAAACGACAC  
CGGGAGCGTGTGGGGCATAGGAGAGGACATACCCTTCGAGGGAGACAACATGTGCT  
ACACTGCACTCCCCTCAAGGAGATCAAAGAAACGGGAACATAGTAGTCGAGAAGA  
TCTTTGCTGGACCAATCATGGGCCCTCTGCTCAACTAGGACTGTCCCTACTTGTGAA  
CGACATCGAGGACGGAGTTCCAAGGATGGTATTCACCGGCGAAATCGCCGATGACG  
AGGAGACAATCATACCAATCTGCGGTGTAGACATCAAAGCCATCGCAGCCCATGAAC  
AAGGGCTGCCACTCATCGGCAACCAACCAGGTGTGGACGAGGAGGTGCAAAACACA  
TCCCTGGCCGCACACCTGATCCAGACCGGAACCCTGCCCGTACAACGCGCACAGGG  
CTCCAACAAGAGGATCAAGTACCTGGGAGAGCTGATGGCATCAAGTGCATCCGGGAT  
GGACGAGGAACTGCAACGCCTCCTGAACGCCACAATGGCACGGGCCAAAGAAGTCC  
AGGACGCCGAGATCTACAACTTCTCAAGCTCATGGCATGGACCAGAAAGAACGACC  
TCACCGACCACATGTACGAGTGGTCAAAGAGGACCCCAATGCACTAAAGTTCGGAA  
AGCTCATCAGCACGCCACCAAAGCACCCCTGAGAAGCCCAAAGGACCAGACCAACACA  
CCGCCCAAGAGGCGAGAGCCACCCGCATATCACTGGACGCCGTGAGAGCCGGGGC  
GGACTTCGCCACACCGGAATGGGTTCGCGCTGAACAACCTACCGCGGCCCATCTCCTG  
GGCAGTTCAAGTACTACCTGATCACTGGACGAGAACCAGAACCAGGCGACGAGTACG  
AGGACTACAGCAATCAATCAATTGTGAAACCGACCGACATGAACAAAATCAGACGTCT  
AGCCAACAGTGTGTACGGCCTCCCACACCAGGAACCAGCACCAGAGGAGTTCTACG  
ATGCAGTTGCAGCTGTATTCGCACAGAACGGAGGCAGAGGTCCCGACCAGGACCAA  
ATGCAAGACCTCAGGGAGCTCGCAAGACAGATGAAACGACGACCCCGGAACGCCGA  
TGCACCACGGAGAACCAGAGCGCCAGCGGAACCGGCACCGCCCGGACGCTCAAGG  
TTCACCCCCAGCGGAAATAACGCTGAGGTGTAACGACTACTCTTTCTGACTGA

## Muestra EBPS1. Segmento B

GGAAACAGTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATACCACGACTGTTTATGTATGCA  
CGCGAGTGCCCCTTTTAAACCTCTACAATATACAACTTATGATATGTCGGACATCTTC  
AATCACCTCAGAACAAGGCTTCTATCTTGAATGCACTCATGAAGAGCACGCAGGGA  
GACGTGGAGGATGTTCTAATACCCAAGCGGTTTCAGACCCGCAAAGGATCCGTTAGAT  
AGCCCCAGGCTGCAGCCGCGTTCCTGAAAGAACAAGTATCGGATACTTAGGCCG  
CGAGCCATACCCACCATGGTTGAAATAGAGACGGATGCCGCTCTGCCTCGACTAGCG  
GCCATGGTGGACGATGGCAAGCTTAAGGAAATGGTCAATGTTCCCGAAGGAACAACC  
GCGTTCTACCCAAAATACTACCCATTCCACAAACCCGACCATGACGACGTGGGAACG  
TTTGGGGCTCCAGACATAAACTACTCAAACAACCTGACGTTCTTCTGCTGGAGAATG  
ACTTTCCAACCTGGTCCAGAAACCCTAAGACAAGTCAGAGAAGCAATCGCAACCCTGC  
AATACGGGTCCGGCAGCTACTCAGGACAACCTCAACAGGCTACTGGCAATGAAGGGC  
GTCGCCACGGGGAGGAATCCCAACAAGACTCCACTGGCCGTTGGCTACACCAACGA  
GCAGATGGCAAGACTGATGGAGCAAACCTTGCCTATCAACCCTCCAAAGAATGAGGA  
CCCAGACCTCCGATGGGCCCAAGCTGGTTGATACAGTACACCGGAGACGCATCAA  
CTGACAAGTCATATCTCCCTCATGTGACAGTCAAGTCATCTGCCGGCCTACCCTACAT  
AGGCAAACCAAAGGAGACACCACGGCTGAAGCCCTGGTGCTGGCAGACTCCTTCAT  
AAGGGACCTCGGAAAAGCCGCAACCTCAGCCGACCCAGAGGCGGACGTCAAGAAAG  
TACTGTCCGACTTCTGGTACCTCAGCTGCGGTCTGCTCTTCCCAAAGGGGAGAGAT  
ACACACAGAAAGACTGGGACTTGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCCCCCTATCCAA  
CGCACCTATTACTATCAATGGTGTGTCGTCACCGGTGATGGATGAGTCAAACTCAACAT  
CACCAACACTCAGACCCCTTCTCTGTATGGGTTCTCACCATTCCATGGTGGGATCAAC  
AGAATCATGACCATCATCAGAGATCATCTAGATCAAGAGCAGGACCTAGTCATGATAT  
ATGCCGACAACATATACTACTACAGGACAACACCTGGTACTCCATCGATCTAGAAAA  
GGGAGAAGCAAACCTGCACACCACAACACATGCAGGCAATGATGTACTACCTGCTCAC  
ACGTGGATGGACAAACGAGGACGGCTCACACGGTACAACCCGACGTGGGCAACAT  
TCGCCATGAACGTTGGGCCCTCAATGGTAGTGGACTCAACCTGCCTGCTGATGAATC  
TGCAGCTGAAGACCTACGGGCAAGGCAGTGGGAATGCCTTCACCTTCTCAACAACC  
ATCTCATGTCCACAATTGTGGTCGCAGAGTGGCACAAGGCAGGAAGGCCAAATCCCA  
TGTCCAAAGAATTCATGGACCTCGAAGCAAAGACGGGGATCAACTTCAAATCGAGC  
GCGAGCTAAAAGACCTAAGGTGATCATCATGGAGGCGGTAGACACCCGCCCACTC  
GACGGCTATCTAGCCGACGGGTCCGACCTGCCACCCAGGGTGCCAGGGAAGGCGG

TGGAGCTCGACCTTCTAGGATGGTCCGCAGTGTACAGCCGACAACCTCGAGATGTTCCG  
TCCCCGTCCTTGAAAACGAAAGACTAATTGCATCAGTCGCCTACCCAAAAGGGCTAG  
AGAACAAATCCCTAGCTCGGAAACCTGGGGCCGAGATCGCATAACCAAATAGTAAGGT  
ATGAAGCGATTCTGGCTCATCGGAGGCTGGAACAATCCACTCATCGAAACGGCAGCAA  
AACACATGTCCCTGGACAAAAGGAAGAGACTGGAGGTAAAAGGCATCGACGTCACCG  
GATTCCTAGACGACTGGAACACCATGTCTGGAGTTCGGAGGCGATCTGGAGGGCATCT  
CACTAACAGCTCCCCTCACAAACCAGACTCTCCTAGACATCAACACGCCAGAGACCG  
AGTTCGACGTCAAAGACAGACCCCCACGCCGCGTTCCCCAGGCAAACCCTCGCC  
GAGGTAACCGCAGCGATAACATCAGGGACCTACAAAGACCCCAAAGTGCAGTGTGG  
AGGCTCCTCGACCAGAGAACCAAACACTACGCGTGAGCACCCCTACGCGATCAGGCGCA  
CGCGCTAAAACCCGCAGCGTCAACATCCGACAACCTGGGGGGACGCCACAGAAGAAC  
TCGCCGAACAACAACAGCTGCTGATGAAGGCAAACAACCTGCTAAAGAGCAGCCTCA  
CGGAAGCGAGGGAAGCCCTCGAAACCGTGCAGTCAGACAAAATAATCTCAGGCAAAA  
CCTCTCCAGAGAAGAATCCCGGGACCGCCGCAAACCCCGTGGTTGGCTATGGAGAA  
TTCAGTGAGAAAATTCTCTCACTCCCACGCAAAGAAGAACGCCAAGCGTCGGGAG  
AAGCAGAGAAGAACTAAGAACGAAGACCAGGGAGCATCCGAAATGAAATGGATGGA  
CTCACAAGAGCTCCGCGCCAAAAGGCAATCCAGACCAAAGTAGTGACCTGAGACAGT  
GCCACCAACATGACCCCTGAA

## Muestra EBPS2. Segmento A

GGAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAGGA  
GCTCTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAACAAACAAACAATCTATATCAATG  
CAAGATGAACACAAACAAGGCAACCGCAACTTACCTGAAATCCATTATGCTTCCAGAG  
ACTGGACCAGCAAGCATCCCGGACGACATAACGGAGAGACACATCCTAAAACAAGAG  
ACCTCGTCATAAACCTAGAGGTCTCCGAATCAGGAAGTGGCATTCTTGTTTGTTC  
CTGGGGCACCGGGCTCACGGATCGGTGCACACTACAGATGGAATGCGAACCCAGACG  
GGGCTGGAGTTCGACCAGTGGCTGGAGACGTGCGCAGGACCTGAAGAAAGCCTTCAA  
CTACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGACATCCAAAGCTCCACACTACCGGCCGG  
TCTCTATGCTCTGAACGGGACGCTCAACGCTGCCACCTTCGAAGGCAGCCTGTCTGA  
GGTGGAGAGCCTGACCTACAACAGCCTGATGTCCCTAACAAACGAACCCCCAGGACAA  
AGTCAACAACCAGCTGGTGACCAAAGGAGTACAGTCCTGAATCTACCAACAGGGTT  
CGACAAACCATACGTCCGCCTAGAGGACGAGACACCCCAGGGTCTCCAGTCAATGAA  
CGGGGCCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCGCGGAGGTACGAGATCGACC  
TCCCATCCCAACGCCTACCCCCGTTGCTGCGACAGGAACCCTCACCACTCTCTATG  
AGGGAAACGCTGACATCGTCAACTCTACGACAGTGGCGGGAGACATAAACTTCAGTC  
TGACAGACCAACCCGCAGTCGAGACCAAGTTCGACTTCCAGCTGGACTTCATGGGCC  
TTGACAACGACGTCCCAGTTGTCACAGTGGTCAGCTCCGTGCTGGCCACAGACGACA  
ACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGAGAACATCACAA  
AGCCGATCACCAGGGTCAAGCTGTCATAACAAGCTCAACCAGCAGACAGCAATCGGCA  
ACATCGCCACCCTGGGCACAATGGGTCCAGCATCCGTCTCCTTCTCATCAGGGAACG  
GGAATGTCCCCGGCGTGCTCAGACCAATCACACTGGTGGCCTATGAGAAGATGACAC  
CGCTGTCCATCCTGACCGTAGCTGGAGTGTCCAACACTACGAGCTGATCCCAAACCCAG  
AACTCCTAAAGAACATGGTAACACGCTATGGCAAGTACGACCCCGAAGGTCTCAACT  
ATGCCAAGATGATCCTGTCCCACAGGGAGGAGCTGGACATCAGGACAGTGTGGAAG  
ACAGAGGAGTACAAGGAGAGGACCAGAGTCTTCAACGAAATCACGGACTTCTCCAGT  
GACCTGCCACGTCAAAGGCATGGGGCTGGAGAGACATAGTCAGAGGAATTCCGGAA  
AGTCGCAGCTCCTGTACTGTCCACGCTGTTTCCAATGGCAGCACCCTCATAGGAAT  
GGCAGACCAATTCATTGGAGATCTCACCAAGACCAACGCAGCAGGCGGAAGGTACCA  
CTCCATGGCCGCAGGAGGGCGCTACAAAGACGTGCTCGAGTCTGGGCAAGCGGAG  
GGCCCGACGGAAAATTCTCCCGAGCCCTCAAGAACAGGCTGGAGTCCGCCAACTAC  
GAGGAAGTCGAGCTTCCACCCCCCTCAAAGGAGTCATCGTCCCTGTGGTGCACACA

GTCAAGAGTGCACCAGGCGAGGCATTTCGGGTCCCTGGCAATCATAATTCCAGGGGA  
GTACCCCGAGCTTCTAGATGCCAACCAGCAGGTCTATCCCCTTCGCAAACGACAC  
CGGGAGCGTGTGGGGCATAGGAGAGGACATACCCTTCGAGGGAGACAACATGTGCT  
ACACTGCACTCCCCTCAAGGAGATCAAAGAAACGGGAACATAGTAGTCGAGAAGA  
TCTTTGCTGGACCAATCATGGGCCCTCTGCTCAACTAGGACTGTCCCTACTTGTGAA  
CGACATCGAGGACGGAGTTCCAAGGATGGTATTCACCGGCGAAATCGCCGATGACG  
AGGAGACAATCATACCAATCTGCGGTGTAGACATCAAAGCCATCGCAGCCCATGAAC  
AAGGGCTGCCACTCATCGGCAACCAACCAGGAGTGGACGAGGAGGTGCAAAACACA  
TCCCTGGCCGCACACCTGATCCAGACCGGAACCCTGCCCGTACAACGCGCACAGGG  
CTCCAACAAGAGGATCAAGTACCTGGGAGAGCTGATGGCATCAAGTGCATCCGGGAT  
GGACGAGGAACTGCAACGCCTCCTGAACGCCACAATGGCACGGGCCAAAGAAGTCC  
AGGACGCCGAGATCTACAACTTCTCAAGCTCATGGCATGGACCAGAAAGAACGACC  
TCACCGACCACATGTACGAGTGGTCAAAGAGGACCCCAATGCACTAAAGTTCGGAA  
AGCTCATCAGCACGCCACCAAAGCACTCTGAGAAGCCCAAAGGACCAGACCAACACA  
CCGCCCAAGAGGCGAGAGCCACCCGCATATCACTGGACGCCGTGAGAGCCGGGGC  
GGACTTCGCCACACCGGAGTGGGTTCGCGTTGAACAACCTACCGCGGCCCATCTCCCG  
GGCAGTTCAAGTACTACCTGATCACTGGACGAGAACCAGAACCAGGCGACGAGTACG  
AGGACTACATAAAACAATCCATTGTGAAACCGACCGACATGAACAAAATCAGACGTCT  
AGCCAACAGTGTGTACGGCCTCCCACACCAGGAACCAGCACCAGAGGAGTTCTACG  
ATGCAGTTGCAGCTGTATTCGCACAGAACGGAGGCAGAGGTCCCGACCAGGACCAA  
ATGCAAGACCTCAGGGAGCTCGCAAGACAGATGAAACGACGACCCCGGAACGCCGA  
TGCACCACGGAGAACCAGAGCGCCAGCGGAACCGGCACCGCCCGGACGCTCAAGG  
TTCACCCCCAGCGGAAATAACGCTGAGGTGTAACGACTACTCTTTCTGACTGA

## Muestra EBPS2. Segmento B

GTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATACCACGACTGTTTATGTATGCACGCGAGT  
GCCCCTTTTAAAACCTCTACAATATACAACCTTATGATATGTCGGACATCTTCAATTCAC  
CTCAGAACAAGGCTTCTATCTTGAATGCACTCATGAAGAGCACGCAGGGAGACGTGG  
AGGATGTTCTAATACCCAAGCGGTTGAGACCCGCAAAGGATCCGTTAGATAGCCCCC  
AGGCTGCAGCCGCGTTTCTGAAAGAACAAGTATCGGATACTTAGGCCGCGAGCCA  
TACCCACCATGGTTGAAATAGAGACGGATGCCGCTCTGCCTCGACTAGCGGCCATGG  
TGGACGATGGCAAGCTTAAGGAAATGGTCAATGTTCCCGAAGGAACAACCGCGTTCT  
ACCCAAAATACTACCCATTCCACAAACCCGACCATGACGACGTGGGAACGTTTGGGG  
CTCCAGACATAACACTACTCAAACAACCTGACGTTCTTCTGCTGGAGAATGACTTTCC  
AACTGGTCCAGAAACCCTAAGACAAGTCAGAGAAGCAATCGCAACCCTGCAATACGG  
GTCCGGCAGCTACTCAGGACAACCTAACAGGCTACTGGCAATGAAGGGCGTCGCCA  
CGGGGAGGAATCCCAACAAGACTCCACTGGCCGTTGGCTACACCAACGAGCAGATG  
GCAAGACTGATGGAGCAAACCTTGCCTATCAACCCTCCAAAGAATGAGGACCCAGAC  
CTCCGATGGGCCCAAGCTGGTTGATACAGTACACCGGAGACGCATCAACTGACAAG  
TCATATCTCCCTCATGTGACAGTCAAGTCATCTGCCGGCCTACCCTACATAGGCAAAA  
CCAAAGGAGACACCACGGCTGAAGCCCTGGTGCTGGCAGACTCCTTCATAAGGGAC  
CTCGGAAAAGCCGCAACCTCAGCCGACCCAGAGGCGGACGTCAAGAAAGTACTGTC  
CGACTTCTGGTACCTCAGCTGCGGTCTGCTCTTCCAAAAGGGGAGAGATACACACA  
GAAAGACTGGGACTTGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCCCCCTATCCAACGCACCT  
ATTACTATCAATGGTGTGTCGTCACCGGTGATGGATGAGTCAAACTCAACATCACCAAC  
ACTCAGACCCCTTCTCTGTATGGGTTCTCACCATTCCATGGTGGGATCAACAGAATCA  
TGACCATCATCAGAGATCATCTAGATCAAGAGCAGGACCTAGTCATGATATATGCCGA  
CAACATATACTACTACAGGACAACACCTGGTACTCCATCGATCTAGAAAAGGGAGAA  
GCAAACCTGCACACCACAACACATGCAGGCAATGATGTACTACCTGCTCACACGCGGA  
TGGACAAACGAGGACGGCTCACCACGGTACAACCCGACGTGGGCAACATTGCCAT  
GAACGTTGGGCCCTCAATGGTAGTGGACTCAACCTGCCTGCTGATGAATCTGCAGCT  
GAAGACCTACGGGCAAGGCAGTGGGAATGCCTTACCTTCTCAACAACCATCTCAT  
GTCCACAATTGTGGTCGCAGAGTGGCACAAGGCAGGAAGGCCAAATCCCATGTCCAA  
AGAATTCATGGACCTCGAAGCAAAGACGGGGATCAACTTCAAATCGAGCGCGAGCT  
AAAAGACCTAAGGTGATCATCATGGAGGCAGTAGACACCGCCCCACTCGACGGCTA  
TCTAGCCGACGGGTCCGACCTGCCACCCAGGGTGCCAGGGAAGGCGGTGGAGCTC

GACCTTCTAGGATGGTCCGCAGTGTACAGCCGACAACCTCGAGATGTTTCGTCCCCGTC  
CTTGAAAACGAAAGACTAATTGCATCAGTCGCCTACCCAAAAGGGCTAGAGAACAAAT  
CCCTAGCTCGAAAACCTGGGGCCGAGATCGCATACCAAATAGTAAGGTATGAAGCGA  
TTCGGCTCATCGGAGGCTGGAACAATCCACTCATCGAAACGGCAGCAAACACATGT  
CCCTGGACAAAAGGAAGAGACTGGAGGTAAAAGGCATCGACGTCACCGGATTCCTAG  
ACGACTGGAACACCATGTTCGGAGTTCGGAGGCGATCTGGAGGGCATCTCACTAACA  
GCTCCCCTCACAAACCAGACTCTCCTAGACATCAACACGCCAGAGACCGAGTTCGAC  
GTCAAAGACAGACCCCCACGCCGCGTTCCCCAGGCCAAAACCCTCGCCGAGGTAAC  
CGCAGCGATAACATCAGGGACCTACAAAGACCCCAAAGTGACAGTGTGGAGGCTCCT  
CGACCAGAGAACCAAACTACGCGTGAGCACCTACGCGATCAGGCGCACGCGCTAA  
AACCCGCAGCGTCAACATCCGACAACCTGGGGGGACGCCACAGAAGAACTCGCCGAA  
CAACAACAGCTGCTGATGAAGGCAAACAACCTGCTAAAGAGCAGCCTCACGGAAGCG  
AGGGAAGCCCTCGAAACCGTGCAGTCAGACAAAATAATCTCAGGCCAAAACCTCTCCA  
GAGAAGAATCCCGGGACCGCCGCAAACCCCGTGGTTGGCTATGGAGAATTCAGTGA  
GAAAATTCCTCTCACTCCCACGCAAAGAAGAACGCCAAGCGTCGGGAGAAGCAGAG  
AAGAACTAAGAACGAAGACCAGGGAGCATCCGAAATGAAATGGATGGACTCACAAG  
AGCTCCGTGCCAAAAGGCAATCCAGACCAAAGTAGTGACCTGAGACAGTGCCACCAA  
CATGACCCCTGAAAA

### Muestra IPNV3. Segmento A

GAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAGGAGC  
TCTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAACAAACAAACAATCTATATCAATGCA  
AGATGAACACAAACAAGGCAACCGCAACTTACCTGAAATCCATTATGCTTCCAGAGAC  
TGGACCAGCAAGCATCCCGGACGACATAACGGAGAGACACATCCTAAAACAAGAGAC  
CTCGTCATAACAACCTAGAGGTCTCCGAATCAGGAAGTGGCATTCTTGTTTGTTCCT  
GGGGCACCAGGCTCACGGATCGGTGCACACTACAGATGGAATGCGAACCCAGACGGG  
GCTGGAGTTCGACCAGTGGCTGGAGACGTGCGCAGGACCTGAAGAAAGCCTTCAACT  
ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGACATCCAAAGCTCCACACTACCGGCCGGTC  
TCTATGCTCTGAACGGGACGCTCAACGCTGCCACCTTCGAAGGCAGTCTGTCTGAGG  
TGGAGAGCCTGACCTACAACAGCCTGATGTCCCTAACAAACGAACCCCCAGGACAAAG  
TCAACAACCAGCTGGTGACCAAAGGAGTCACAGTCTGAATCTACCAACAGGGTTCG  
ACAAACCATACGTCCGCCTAGAGGACGAGACACCCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACG  
GGGCCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCGCGGAGGTACGAGATCGACCTC  
CCATCCCAACGCCTACCCCCGTCACTGCGACAGGAACCCTCACCCTCTCTACGAG  
GAAACGCCGACATCGTCAACTCCACGACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTG  
GCAGAACAACCCGCAGTCGAGACCAAGTTCGACTTCCAGCTGGACTTCATGGGCCTT  
GACAACGACGTCCCAGTTGTACAGTGGTCAGCTCCGTGCTGGCCACAAATGACAAC  
TACAGAGGAGTCTCAGCCAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGAGAACATCACAAAG  
CCGATCACAAGGGTCAAGCTGTCATAAAGCTCAACCAGCAGACAGCAATCGGCAAC  
GCCGCCACCCTGGGCACAATGGGCCCAGCATCCGTCTCCTTCTCATCAGGGAAACGG  
GAATGTCCCCGGCGTGCTCAGACCAATCACACTGGTGGCCTATGAGAAGATGACACC  
GCTGTCCATCCTGACCGTAGCTGGAGTGTCCAACACTACGAGCTGATCCCAAACCCAGA  
ACTCCTAAAGAACATGGTAACACGCTATGGCAAGTACGACCCCGAAGGTCTCAACTAT  
GCCAAGATGATCCTGTCCCACAGGGAAGAGCTGGACATCAGGACAGTGTGGAGGAC  
AGAGGAGTACAAGGAGAGGACCAGAGTCTTCAACGAAATCACGGACTTCTCCAGTGA  
CCTGCCACGTCAAAGGCATGGGGCTGGAGAGACATAGTCAGAGGAATTCGGAAAG  
TCGCAGCTCCTGTACTGTCCACGCTGTTTCCAATGGCAGCACCACTCATAGGAATGG  
CAGACCAATTCATTGGAGATCTACCAAGACCAACGCAGCAGGGCGGAAGGTACCACT  
CCATGGCCGCAGGAGGGCGCCACAAAGACGTGCTCGAGTCCCTGGGCAAGCGGAGG  
GCCCGACGGAAAATTCTCCCGAGCCCTCAAGAACAGGCTGGAGTCCGCCAACTACG  
AGGAAGTCGAGCTTCCACCCCCCTCAAAGGAGTCATCGTCCCTGTGGTGCACACAG

TCAAGAGTGCACCAGGCGAGGCATTCGGGTCCTGGCAATCATAATTCCAGGGGAGT  
ACCCCGAGCTTCTAGATGCCAACCAGCAGGTCCTATCCCACTTCGCAAACGACACCG  
GGAGCGTGTGGGGCATAGGAGAGGACATACCCTTCGAGGGAGACAACATGTGCTAC  
ACTGCACTCCCACTCAAGGAGATCAAAAGAAACGGGAACATAGTAGTCGAGAAGATC  
TTTGCTGGACCAATCATGGGTCCCTCCGCTCAACTAGGACTGTCCCTACTTGTGAAC  
GACATCGAGGACGGAGTTCCAAGGATGGTATTCACCGGCGAAATCGCCGATGACGA  
GGAGACAATCATACCAATCTGCGGTGTAGACATCAAAGCCATCGCAGCCCATGAGCA  
AGGGCTGCCACTCATCGGCAACCAACCAGGAGTGGACGAGGAGGTGCGAAACACAT  
CCCTGGCCGCACACCTGATCCAGACCGGAACCCTGCCCGTACAACGCGCAAAGGGC  
TCCAACAAGAGGATCAAGTACCTGGGAGAGCTGATGGCATCAAATGCATCCGGGATG  
GACGAGGAAGTGAACGCCTCCTGAACGCCACAATGGCACGGGCCAAAGAAGTCCA  
GGACGCCGAGATCTACAACTTCTCAAGCTCATGGCATGGACCAGAAAGAACGACCT  
CACCGACCACATGTACGAGTGGTCAAAAGAGGACCCCAATGCACTAAAGTTCGGAAA  
GCTCGTCAGCACGCCACCAAAGCACCCCGAGAAGCCCAAAGGACCAGACCAACACC  
ACGCCCAAGAGGCGAGAGCCACCCGCATATCACTGGACGCCGTGAGAGCCGGGGC  
GGACTTCGCCACACCGGAATGGGTGCGCTGAACAACCTACCGTGGCCCATCTCCCG  
GGCAGTTCAAGTACTACCTGATCACTGGACGAGAACCAGAACCAGGCGACGAGTACG  
AGGACTACATAAAACAACCCATTGTGAAACCGACCGACATGAACAAAATCAGACGTCT  
AGCCAACAGTGTGTACGGCCTCCCACACCAGGAACCAGCACCAGAGGAGTTCTACG  
ATGCAGTTGCAGCTGTATTCGCACAGAACGGAGGCAGAGGTCCCGACCAGGACCAA  
ATGCAAGACCTCAGGGAGCTCGCAAGACAGATGAAACGACGACCCCGGAACGCCGA  
TGCACCACGGAGAACCAGAGCGCCAGCGGAACCGGCACCGCCCGGACGCTCAAGG  
TTCACCCCCAGCGGAGATAACGCTGAGGTGTAACGACTACTCTCTTTCCTGACTG

### Muestra IPNV3. Segmento B

GAAACAGTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATACCACGACTGTTTATGTATGCAC  
GCGAGTGCCCCTTTTAAAACCTCTACAATATACAACCTTATGATATGTCGGACATCTTCA  
ATTCACCTCAGAACAAGGCTTCTATCTTGAATGCACTCATGAAGAGCACGCAGGGAG  
ACGTGGAGGATGTTCTAATACCCAAGCGGTTCCAGACCCGCAAAGGATCCGTTAGATA  
GCCCCCAGGCTGCAGCCGCGTTCCTGAAAGAACAAGTATCGGATACTTAGGCCG  
CGAGCCATACCCACCATGGTTGAAATAGAGACGGATGCCGCTCTGCCTCGACTAGCG  
GCCATGGTGGATGATGGCAAGCTTAAGGAAATGGTCAATGTTCCCGAAGGAACAGCC  
GCGTTCTACCCCAAATACTACCCATTCCACAAACCCGACCATGACGACGTGGGAACG  
TTTGGGGCTCCAGACATAAACTACTCAAACAACCTGACGTTCTTCTGCTGGAGAATG  
ACTTTCCAACCTGGTCCAGAAACCCTAAGACAAGTCAGAGAAGCAATCGCAACCCTGC  
AATACGGGTCCGGCAGCTACTCAGGACAACCTCAACAGGCTACTGGCAATGAAGGGC  
GTCGCCACGGGGAGGAATCCCAACAAGACTCCACTGGCCGTTGGCTATACCAACGA  
GCAGATGGCAAGACTGATGGAGCAAACCTTGCCTATCAACCCTCCAAAGAATGAGGA  
CCCAGACCTCCGATGGGCCCAAGCTGGTTGATACAGTACACCGGAGACGCATCAA  
CTGACAAGTCATATCTCCCTCATGTGACAGTCAAGTCATCTGCCGGCCTACCCTACAT  
AGGAAAAACCAAAGGAGACACCACGGCCGAAGCCCTGGTGCTGGCAGACTCCTTCA  
TAAGGGACCTCGGAAAAGCCGCAACATCAGCCGACCCAGAGGCGGACGTCAAGAAA  
GTACTGTCCGACTTCTGGTACCTCAGCTGCGGTCTGCTCTTCCCAAAGGGGAGAGA  
TACACACAGAAAGACTGGGACTTGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCCCCCTATCCA  
ACGCACCTACTACTATCAATGGTGTGTCGTCACCGGTGATGGATGAGTCAAACTCAACA  
TCACCAACACTCAGACCCCTTCTCTGTACGGGTTCTCACCATTCCACGGTGGGATCAA  
CAGAATCATGACCATCATCAGAGAGCATCTAGATCAAGAGCAGGACCTAGTCATGATA  
TATGCCGACAACATATACTACTACAGGACAACACCTGGTACTCCATCGATCTAGAAA  
AGGGAGAAGCAAACCTGCACACCACAACACATGCAGGCAATGATGTACTACCTGCTCA  
CACGCGGATGGACAAACGAGGACGGCTCACCACGATACAACCCGACGTGGGCAACA  
TTCGCCATGAACGTTGGGCCCTCAATGGTAGTGGACTCAACCTGCCTGCTGATGAAT  
CTGCAGCTGAAGACCTACGGGCAAGGCAGTGGGAACGCCTTACCTTCTCAACAAC  
CATCTCATGTCCACAATTGTGGTTCGCGGAGTGGCACAAAGCAGGAAGGCCAAATCCC  
ATGTCAAAGAATTCATGGACCTCGAAGCAAAGACGGGGATCAACTTCAAATCGAG  
CGCGAGCTAAAAGACCTAAGGTGATCATCATGGAGGCGGTAGACACCGCCCCACT  
CGACGGCTATCTAGCCGACGGATCCGACCTGCCACCCAGGGTGCCAGGGAAGGCG

GTGGAGCTCGACCTTCTAGGATGGTCCGCAGTGTACAGCCGACAACCTCGAGATGTTT  
GTCCCCGTCTTTGAAAACGAAAGACTAATTGCATCAGTCGCCTACCCAAAAGGGCTA  
GAGAACAAATCCCTAGCTCGAAAACCCGGGGCCGAGATCGCATACCAAATAGTAAGG  
TATGAAGCAATTTCGGCTCATCGGAGGCTGGAACAATCCACTCATCGAAACGGCAGCA  
AAACACATGTCCCTGGACAAAAGGAAGAGACTGGAGGTAAAAGGCATCGACGTCACC  
GGATTCCTAGACGACTGGAACACCATGTTCGGAGTTTCGGAGGCGATCTGGAGGGCAT  
CTCACTAACAGCTCCCCTCACAAACCAGACTCTCCTAGACATCAACACGCCAGAGAC  
CGAGTTCGACGTCAAAGACAGACCCCCACGCCGCGTTCCCCAGGCAAACCCCTCG  
CCGAGGTAACCGCAGCGATAACATCAGGGACCTATAAAGACCCCAAAGTGCAAGTGT  
GGAGGCTCCTCGACCAAAGAACCAAAACCTACGCGTGAGCACCCCTACGTGATCAGGCG  
CACGCGCTAAAACCCGCAGCGTCAACATCCGACAACCTGGGGGGACGCCACGGAAGA  
ACTCGCCGAACAACAACAGCTGCTGATGAAGGCAAACAACCTGCTAAAGAGGAGCCT  
CACGGAAGCGAGGGGAAGCCCTCGAAACCGTGCAGTCAGACAAAATAATCTCAGGCAA  
AACCTCTCCAGAGAAGAATCCCGGGACCGCCGCAAACCCCGTGGTTGGCTATGGAG  
AATTCAGCGAGAAAATTCCTCTCACTCCCACGCAAAGAAGAACGCCAAGCGTCGGG  
AGAAGCAGAGAAGAACTAAGAACGAAGACCAGGGAGCATCCGAAATGAAATGGATG  
GACTCACAAGAGCTCCGCGCCAGAAGGCAATCCAGACCAAAGTAGTGACCTGAGACA  
GTGCCACCAACATGACCCCTGAAA

**Muestra IPNV11. Segmento A**

GAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAGGAGC  
TCTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAACAACCAACAATTCTATTTACATGAAT  
CATGAATACAACAAAGGCAACCGCAACTTACCTGAGATCCATTATGCTTCCCGAGAAT  
GGACCAGCAAGCATTCCGGATGACATAACAGAGAGACACATACTAAAACAAGAGACC  
TCATCATACAACTTAGAGGTCTCCGACTCAGGAAGTGGGCTTCTTGTCTGCTTCCCTG  
GGGCTCCCGGATCCAGAGTCCGGTGCCACTACAGGTGGAATCTGAACCAGACGGAA  
CTGGAATTCGACCGGTGGTTGGAAACATCACAGGACCTGAAGAAAGCATTAACTAC  
GGGAGGTTGATCTCACGGAATACGACATCCAGAGCTCGACCCTTCCCGCTGGCCTC  
TATGCACTCAACGGGACCCTGAATGCAGCTACCTTCGAAGGAAGTCTTTCTGAGGTG  
GAGAGCCTGACCTATAACAGCTTGATGTCCCTGACAACAAACCCCCAGGACAAGGTC  
AACAAACCACTAGTGACCAAAGGAATAACCGTCTGAACTTCCAACCTGGGTTTTGACA  
AGCCATACGTCCGCCTTGAGGACGAGACACCGCAGGGCTCCCAGTCCATGAACGGA  
GCCAGGATGAGGTGCACCGCTGCAATCGCACCAAGGAGGTACGAAATAGACCTCCC  
ATCTGAGCGCCTACCAACCGTGGCAGCAACTGGGACCCCAACAACAATTTATGAAGG  
GAACGCCGACATTGTGAACTCAACCACAGTGACAGGAGACGTAACCTTCCAACCTAGC  
AGCCGAACCCGCCAATGAGACGCGGTTTCGACTTCATCCTACAATTCCTTGGGCTTGA  
CAATGATGTGCCCGTGGTCTCCGTGACAAGCTCAACCCTGGTCACGGCCGACAACCTA  
CAGGGGCGCCTCCGCCAAGTTTACGCAGTCAATCCCAACGGAACCTAATAACTAAGCC  
CATTACAAGGGTCAGGCTGGCCTACCAGCTCAACCAGCAGGCCGAAATCGGAAACG  
CCGCAACACTCGGGGCCACTGGGCCCGCGTCAGTCTCATTCTCATCAGGGAATGGC  
AATGTGCCAGGGGTTCTAAGACCCATAACCTTGGTGGCATAACGAGAAGATGACCCCC  
CAGTCAATTCTGACCGTGGCCGGCGTATCCAACCTATGAGCTGATCCCCAACCCAGAC  
CTCCTGAAGAACATGGTCACTAAGTATGGCAAATATGACCCTGAGGGCCTCAACTATG  
CTAAGATGATCCTATCCCACAGGGAGGAGCTAGACATTAGAAGTGTCTGGAGGACCG  
AGGAGTACAAGGAGAGGACAAGAGCCTTCAATGAGATCACTGACTTCACAAGTGACC  
TGCCAACATCAAAGCATGGGGGTGGAGAGACCTGGTCAGAGGCATCAGAAAAGTG  
GCAGCACCAGTGCTGTCAACGCTCTTCCCAATGGCCGCCCACTTATAGGCGCGGC  
CGACCAGTTCATCGGTGACCTCACCAAGACCAACTCAGCCGGGGGGCGCTACCAGT  
CACATGCGGCTGGAGGCCGCTACCGCGACGTCATGGACACATGGGCTAGTGGCTCC  
GAGACAGGAAGCTACTCAAAGCACCTTAAGACCCGGCTTGAGTCCAACAACCTATGAG  
GAAGTGGAGCTTCCCAAGCCAACAAAAGGAGTCATCTTTCCTGTGGTGCACACCGTA

GAAAGTGCACCAGGTGAGGCCTTCGGGTCGCTCGTGGTTGTGATACCAGGAGCATA  
CCCGGAACTTCTTGACCCAAACCAACAGGTCCTATCCTACTTCAAGAACGACACAGG  
CTGTGTCTGGGGGATAGGAGAAGACATTCCATTTGAAGGAGATGACATGTGCTACAC  
CGCACTGCCCCTAAAGGAGATCAAGAGGAACGGCAACATCGTAGTGAGAAAATATT  
CGCTGGCCCTGCGATGGGACCGTCGGCCCAACTTGCGCTGTCCCTACTAGTCAACG  
ACATAGACGAGGGGATTCCAAGGATGGTCTTCACAGGGGAGATTGCTGATGACGAG  
GAAACAGTCATCCCGATCTGCGGAGTAGACATCAAAGCCATTGCCGCCCATGAACAT  
GGGCTGCCACTCATTGGCTGCCAACCAGGGGTCGACGAGATGGTGGCAAACACATC  
TCTCGCATCACACCTGATTCAGAGCGGCGCCCTACCAGTGCAGAAAGCACAGGGAG  
CCTGCAGGAGAATCAAGTACCTGGGCCAACTGATGAGAACAACACTGCATCAGGGATGG  
ACGAGGAACTGCAGGGGCTGCTGCAGGCCACCATGGCCAGAGCAAAGGAAGTCAAG  
GATGCCGAGGTGTTCAAACCTTCTGAAGCTGATGTCCTGGACACGGAAGAACGACCTC  
ACAGACCACATGTACGAGTGGTCAAAGAGGACCCTGATGCAATCAAGTTTGGCAGG  
CTCATCAGCACCCCCCAAACACCAAGAGAAGCCAAAAGGACCCGACCAGCACACC  
GCCAGGAGGCAAAGCAACCAGAATATCACTGGACGCCGTCAAAGCCGGAGCAGA  
CTTTGCCTCACCCGAGTGGATTGCAGAGAACAACACTACCGCGGTCCAGCTCCAGGTCA  
GTTCAAGTACTACATGATAACGGGCAGAGTCCCAAACCCCGGAGAAGAGTACGAGGA  
CTACGTGCGAAAACCGATAACCCGACCAACCGACATGGACAAGATCAGACGCCTAGC  
CAACAGTGTTTACGGACTACCCACCAAGAGCCCGCACCCGGACGACTTCTACCAAGC  
AGTCGTCGAGGTGTTGCGCCGAGAATGGGGGGAGAGGACCCGACCAAGACCAAATGC  
AAGACCTGAGGGACTTGGCAAGGCAGATGAAACGACGACCCAGACCAGCTGATGCA  
CGCAGGCAAACCAGGACTCCACCGAGGGCGGCAACCTCCGGTGGTTCACGGTTTAC  
CCCCTCCGGCGACGACGGAGAAGTGTAACGACTACTCTTTCTGACTG

## Muestra IPNV11. Segmento B

GTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATAACCACGACTGTTTATGTATGCACGCAAGT  
GCCCCTTAATAAATCCCTATACACACAACTCATGATATGTCGGACATCTTCAACTCACC  
ACAGAACAAGGCTTCTATCTTGAGCGCTCTAATGAGGAGCACAGCAGGAGATGTAGA  
GGATGTGCTAATACCAAACGCTTCAGGCCCGCCAAGGACCCCCTTGACAGCCCTCA  
GGCAGCAGCACAGTTCCTGAAGGACAACAAGTATCGGATACTTAGGCCGCGAGCCAT  
TCCGACCATGGTCGAACTAGAGACAGATGCCGCTCTGCCCCGACTGCGACAAATGGT  
GGACGATGGCAAGCTTAAGGACACGGTAAGCGTCCCAGAAGGAACCACTGCATTCTA  
CCCCAAATACTATCCATTCCACAAGCCAGACCATGATGAGGTGGGGACGTTCCGGGGC  
TCCGGACATCACGCTTCTGAAGCAACTTACCTTCTTCTGTTGGAGAACGACTTCCCC  
ACAGGACCAGATACTCAGGCAGGTACGTGAGGCCATAGCTACACTCCAGTATGGA  
TCAGGCAGCTACTCCGGACAGCTAAACAGGCTCCTGGCCATGAAGGGAGTTGCCAC  
CGGCAGGAATCCAAACAAGACTCCAAAACAGTAGGCTACACAAACGAGCAGCTAGC  
AAAAGTCTGGAGCAGACATTACCGATCAACACCCCAAACATGAGGACCCCGACCT  
CCGGTGGGCCCCAGCTGGTTGATCAACTACACCGGAGACCTGAGCACGGACAAGT  
CATACCTGCCACACGTGACTATAAAGTCCTCAGCCGGCCTACCCTACATAGGCAAAA  
CCAAAGGAGACACGACTGCAGAGGCGCTCGTACTGGCTGACTCCTTCATACGTGACC  
TCGGAAAAGCAGCCACATCAGCCGATCCAGAAGCGGGAGTGAAGAAAACCATCACTG  
ACTTCTGGTACCTGAGCTGTGGGCTGCTCTTCCCGAAGGGCGAGAGATACACACAGA  
TTGACTGGGACAAGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCGCCCTACCCAACACACCTAC  
TACTATCAATGGTGTTCATCCCCAGTAATGGACGAGTCAAACTCAACATTACCAACAC  
CCAGACACCATCCCTGTATGGGTTCTCCCCATTCCACGGAGGGATGGACAGAATCAT  
GACCATCATCAGAGACAGTCTGGACAACAACGAGGACCTAGTGATGATCTATGCAGA  
CAACATTTACATACTGCAGGACAACACGTGGTACTCAATAGACCTAGAAAAGGGCGA  
GGCCAACTGCACTCCACAACACATGCAGGCCATGATGTACTIONCTCCTGACCAGGGG  
GTGGACGAACGAGGATGGCTCTCCGCGGTACAATCCGACATGGGCAACATTCGCTAT  
GAATGTGGCCCCGTCGATGGTCGTGGACTCCTCCTGTCTTCTGATGAACCTTCAGCT  
GAAGACCTACGGCCAGGGCAGTGGGAACGCCTTTACCTTCCTAAATAACCACCTCAT  
GTCAACGATCGTCGTGGCCGAGTGGGTAAAAGCCGGGAAGCCAAACCCCATGACAA  
AAGAGTTCATGGACCTCGAGGAGAAGACGGGGATCAACTTTAAGATAGAGCGCGAGC  
TAAAGAACTTGAGAGAAACCATCATCGAGGCCGTGGAGACGGCCCCCAGGATGGC  
TACCTCGCCGATGGATCCGATCTACCCCCGAACAGACCAGGGAAAGCCGTGAGCT

AGAGCTTCTTGGCTGGTCAGCCATCTACAGCCGCCAAATGGAGATGTTCGTCCCAAT  
CCTCGAGAACGAGCGACTAATTGCCTCAGCGGCCTACCCCAAGGGACTTGAGAACAA  
GACCTTGGCCCGGAAACCCGGGGCCGAGATTGCGTACCAGATAGTGCGGTATGAAG  
CAATCAGGCTGGTGGGCGGCTGGAACAATCCACTGCTAGAAACCGCAGCCAAACAC  
ATGTCCCTTGACAAGAGAAAGAGACTGGAGGTGAAGGGGCTGGACGTCACCGGGTT  
CCTAGATGCCTGGAACGATATGTCAGAATTCGGCGGAGACCTGGAAGGCATAACGCT  
GTCCGAGCCCCTCACAAACCAAACCTCTGATTGACATCAACACACCCCTGGAGAGCTT  
CGACCCCAAAGCCAGGCCACAAACACCACGGTCACCAAAGAAAACCCTGGACGAGG  
TGACGGCCGCCATTACATCAGGGACCTACAAGGACCCCAAGAGCGCAGTGTGGCGA  
CTGCTAGACCAAAGGACCAAACCTCCGGGTCAGCACACTGCGAGACCAAGCGTCAGC  
ACTGAAACCAGCCTCGTCCTCGGTGCAAACTGGGCCGAAGCCACAGAGGAGCTAG  
CGGAGCAACAACAACCTTCTCATGAAGGCCAACAACTGCTAAAGAGCAGCTTGACGG  
AAACAAGAGAGGCACTGGAGACCATCCAGTCTGACAAAATCATCGCCGGGAAGTCCA  
ACCCTGAAAAGAACCAGGGACCGCAGCCAACCCAGTGGTTGGCTACGGGGAATTC  
AGCGAGAAGATTCTCTGACTCCCACGCAGAAAAAGAATGCCAAGCGGAGGGAGAA  
GCAGAGAAGAAACCAGTAAGAAGACCAAACCGGGAAGAATCCGAAATGACCCAGCT  
GGACTCATATGCAAGCTCCGCGCCGCAAGGCAAGCTGAACCAAAGTAGTGACCCGA  
CAATGTGCCACCAACATGACCCCTGAAAAA

**Muestra LKJH6. Segmento A**

GGAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAGGA  
GCTCTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAATAACCAACAACCTCCATCTACATG  
AATCATGAACACAACAAAGGCAACCGCAACCTACTTGAGATCCATTATGCTTCCCGAG  
AATGGACCAGCAAGCATTCCGGACGACATAACAGAGAGACACATACTAAAACAAGAG  
ACCTCATCATACAACTTAGAGGTCTCCGACTCAGGAAGTGGGCTTCTTGTCTGCTTCC  
CTGGGGCTCCTGGATCCAGAGTCGGTGCCCACTACAGGTGGAATCCGAACCAGACG  
GAACTGGAATTCGACCGGTGGTTGGAAACATCACAGGACCTGAAGAAAGCATTCAAC  
TACGGGAGGTTGATCTCACGGAAATACGACATCCAGAGCTCGACCCTTCCCGCTGGC  
CTCTATGCACTCAACGGGACCCTGAATGCAGCTACCTTCGAAGGAAGTCTTTCTGAG  
GTGGAGAGCCTGACCTATAACAGCTTGATGTCCCTGACAACAAACCCCCAGGACAAG  
GTCAACAACCAACTAGTGACCAAAGGAATAACCGTCCTGAACCTTCCAACCTGGGTTTG  
ACAAGCCATACGTCCGCCTTGAGGACGAGACACCGCAGGGCCCCCAGTCCATGAAC  
GGAGCCAGGATGAGGTGCACCGCTGCAATCGCACCAAGGAGGTACGAAATAGACCT  
CCCATCTGAGCGCCTACCAACCGTGGCAGCAACTGGGACCCCAACAACAATCTATGA  
AGGGAACGCCGACATTGTGAATTCAACCACAGTGACAGGAGACGTAACCTTCCAAC  
AGCAGCCGAACCCGTCAATGAGACGCGGTTTCGACTTCATCCTACAATTCCTTGGGCT  
TGACAATGATGTGCCCGTGGTCTCCGTGACAAGCTCAACCCTGGTCACGGCCGACAA  
CTACAGGGGTGCCTCCGCCAAGTTTACGCAGTCAATCCCAACGGAACATAACTAA  
GCCATTACAAGGGTCAGGCTGGCTTATCAGCTCAACCAGCAGACCGCAATCGGAAA  
CGCCGCAATACTCGGGGCCATAGGACCCGCGTCAGTCTCATTCTCATCAGGGAATGG  
CAATGTGCCGGGGTTCTAAGACCCATAACCTTGGTGGCATAACGAGAAGATGACCCC  
CCAGTCAATTCTGACCGTGGCTGGCGTATCCAACCTACGAGCTGATCCCAACCCAGA  
CCTCCTGAAGAATATGGTCACCAAGTATGGCAAATATGACCCTGAGGGCCTTAACCTAT  
GCCAAGATGATCCTATCCCACAGGGAGGAGCTAGACATCAGAACTGTCTGGAGGACC  
GAGGAGTACAAGGAGAGGACAAGAGCCTTCAATGAGATCACTGACTTTACAAGTGAC  
CTGCCAACATCAAAAGCATGGGGGTGGAGAGACCTGGTCAGAGGCATCAGAAAAGT  
GGCAGCACCAAGTGCTGTCAACGCTCTTCCCAATGGCCGCCCACTTATAGGTGCGG  
CCGACCAGTTCATCGGTGACCTACCAAGACCAACTCAGCCGGGGGGCGCTACCTG  
TCACATGCAGCTGGAGGCCGCTACCGTGATGTCATGGACACATGGGCCAGTGGCTC  
CGAGACAGGAAGCTACTCAAAGCACCTTAAGACCCGGCTTGAGTCCAACAACCTATGA  
GGAAGTGGAGCTTCCCAAGCCAACAAAAGGAGTCATCTTTCCTGTGGTGCACACCGT

AGAAAGTGCACCAGGTGAGGCCTTCGGGTCGCTCGTGGTTGTGATACCAGGAGCAT  
ACCCGGAACCTTCTTGACCCAAACCAACAGGTCTATCCTACTTTAAGAACGACACAGG  
CTGTGTCTGGGGGATAGGAGAAGACATTCCATTTGAAGGAGATGACATGTGCTACAC  
CGCACTGCCCCTAAAGGAGATCAAGAGGAACGGCAACATCGTAGTGGAGAAAATATT  
CGCTGGCCCTGCGATGGGACCGTCGGCCCAACTTGCGCTGTCCCTACTAGTCAACG  
ACATAGACGAGGGGATTCCAAGGATGGTCTTCACAGGGGAGATTGCTGATGACGAG  
GAAACAGTCATCCCGATCTGCGGAGTAGACATCAAAGCCATTGCCGCCCATGAACAT  
GGGCTGCCACTCATTGGCTGCCAACCAGGGGTCGACGAGATGGTGGCAAACACATC  
TCTCGCATCACACCTGATTCAGAGCGGCGCCCTACCAGTGCAGAAAGCACAGGGGG  
CCTGCAGGAGAATCAAGTACCTGGGCCAACTGATGAGAACAACCTGCATCAGGGATGG  
ACGAGGAACTGCAGGGGCTGCTGCAGGCCACCATGGCCAGAGCAAAGGAAGTCAAG  
GACGCCGAGGTGTTCAAACCTCTGAAGCTGATGTCCTGGACACGGAAGAACGACCTC  
ACAGACCACATGTACGAGTGGTCAAAGAGGACCCTGATGCAATCAAGTTTGGCAGG  
CTCATCAGCACCCCCCAAACACCAAGAGAAGCCAAAAGGACCTGACCAGCACACC  
GCCCAGGAGGCAAAGCAACCAGAATATCACTGGACGCCGTCAAAGCCGGAGCAGA  
CTTTGCCTCACCCGAGTGGATTGCAGAGAACAACCTACCGCGGTCCAGCTCCAGGTCA  
GTTCAAGTACTACATGATAACGGGCAGAGTCCCAAACCCCGGAGAAGAGTACGAGGA  
CTACGTGCGAAAACCGATAACCCGACCAACCGACATGGACAAGATCAGACGCCTAGC  
CAACAGTGTTTACGGACTACCCACCAAGAGCCCGCACCCGGACGACTTCTACCAAGC  
AGTCGTCGAGGTGTTTCGCCGAGAATGGGGGGAGAGGACCCGACCAAGACCAAATGC  
AAGACCTGAGGGACTTGGCAAGGCAGATGAAACGACGACCCAGACCAGCTGATGCA  
CGCAGGCAAACCAGGACTCCACCGAGGGCGGCAACCTCCGGTGGTTCACGGTTTAC  
CCCCTCCGGCGACGACGGAGAAGTGTAACGACTACTCTTTCTGACTG

**Muestra LKJH6. Segmento B**

CGGCCAGAAACAGTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATACCACGACTGTTTATGT  
ATGCACGCAAGTGCCCTTAACAAATTTCTATACACAACTCATGATATGTCCGACA  
TCTTCAACTCACCACAGAACAAGGCTTCTATCTTGAGCGCTCTAATGAAGAGCACTGC  
AGGAGATGTAGAGGATGTGCTAATACCAAACGCTTCAGGCCCGCCAAGGACCCCT  
TGACAACCCTCAGGCAGCAGCACAGTTCCTGAAGGACAACAAGTATCCGATACTTAG  
GCCGCGAGCCATTCCGACCATGGTCTGAACTAGAGACAGATGCCGCTCTGCCCGAC  
TGCGACAAATGGTGGACGATGGCAAGCTCAAGGACACGGTAAGCGTCCCAGAAGGA  
ACCACTGCATTCTACCCCAAATACTATCCATTCCACAAGCCAGACCATGATGAGGTGG  
GGACGTTCCGGGGCTCCGGACATCACGCTTCTGAAGCAACTTACCTTCTTCTGTTGG  
AGAACGACTTCCCCACAGGACCAGATACACTCAGGCAGGTACGTGAGGCCATAGCTA  
CACTCCAGTATGGATCAGGCAGCTACTCCGGACAGCTAAACAGGCTCCTGGCCATGA  
AGGGAGTTGCAACCGGCAGGAATCCAAACAAGACTCCAAAAACAGTAGGCTACACAA  
ACGAGCAGCTAGCAAACTGCTGGAGCAGACACTACCGATCAACACCCCAAAACATG  
AGGACCCCGACCTCCGGTGGGCCCCAGCTGGTTGATCAACTACACCGGAGACCTG  
AGCACAGACAAGTCATACCTGCCACACGTGACTATAAAGTCCTCAGCCGGCCTACCC  
TACATAGGCAAACCAAAGGAGACACGACTGCAGAGGCGCTCGTACTGGCTGACTCC  
TTCATACGTGACCTCGGAAAAGCAGCCACATCAGCCGATCCAGAAGCGGGAGTGAAG  
AAAACCATCACTGACTTCTGGTACCTGAGCTGTGGGCTGCTCTTCCCGAAGGGCGAG  
AGATACACACAGATTGACTGGGACAAGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCGCCCTAC  
CCAACACACCTACTACTATCAATGGTGTTCATCCCCAGTAATGGACGAGTCAAACTCA  
ACATTACCAACACCCAGACACCATCTCTGTATGGGTTCTCCCCATTCCACGGAGGGAT  
GGACAGAATCATGACCATCATCAGAGACAGTCTGGACAACAACGAGGACCTAGTGAT  
GATCTATGCAGACAACATTTACATACTGCAGGACAACACGTGGTACTCAATAGACCTA  
GAAAAGGGCGAGGCCAACTGCACTCCACAACACATGCAGGCCATGATGTACTACCTC  
CTGACCAGGGGGTGGACAAATGAGGATGGCTCTCCGCGGTACAATCCGACATGGGC  
AACATTCGCCATGAATGTGGCCCCGTCGATGGTCGTGGACTCCTCCTGTCTTCTGAT  
GAACCTTCAGCTGAAGACCTACGGCCAGGGCAGTGGGAACGCCTTTACCTTCTTAA  
CAACCACCTCATGTCAACGATCGTCGTGGCCGAGTGGGTAAAAGCCGGGAAGCCAA  
ACCCCATGACAAAAGAGTTCATGGACCTCGAGGAGAAGACGGGGATCAACTTTAAGA  
TAGAGCGCGAGCTAAAGAACTTGAGAGAAACCATCATCGAGGCCGTGGAGACGGCC  
CCCCAGGATGGCTACCTCGCCGATGGCTCCGATCTACCCCGAACAGACCAGGGAA

AGCCGTCGAGCTAGACCTTCTTGGCTGGTCAGCCATCTACAGCCGCCAAATGGAGAT  
GTTTCGTCCCAATCCTCGAGAACGAGCGACTAATTGCCTCAGCGGCCTACCCCAAGGG  
GCTTGAGAACAAGACCTTGGCCCGGAAACCCGGGGCCGAGATTGCGTACCAGATAG  
TGCGGTATGAAGCAATCAGGCTGGTGGGCGGCTGGAACAATCCACTGCTAGAAACA  
GCAGCCAAACACATGTCCCTTGACAAGAGAAAGAGACTGGAGGTGAAGGGGCTGGA  
CGTCACCGGGTTTCTAGATGCCTGGAACGATATGTCAGAATTCGGCGGAGACCTGGA  
AGGCATAACGCTGTCCGAGCCCCTCACAAACCAAACCTCTGATTGACATCAACACACC  
CCTGGAGAGCTTCGACCCCAAGCCAGGCCACAAACACCACGGTCACCAAAGAAAAC  
CCTGGACGAGGTGACGGCTGCCATTACATCAGGGACCTACAAGGACCCCAAGAGCG  
CAGTGTGGCGACTGCTAGACCAAAGGACCAAACCTCCGGGTCAGCACACTGCGAGAC  
CAAGCGTCAGCACTGAAACCGGCCTCGTCCTCGGTCGACAACCTGGGCCGAAGCCAC  
AGAGGAGCTAGCGGAGCAACAACAACCTTCTCATGAAGGCCAACCAACCTGCTAAAGAG  
CAGCTTGACGGAAACAAGAGAGGCACTGGAGACCATCCAGTCTGACAAAATCATCAC  
CGGGAAGTCCAACCCTGAAAAGAACCCAGGGACCGCAGCCAACCCCGTGGTTGGCT  
ACGGGGAATTCAGCGAGAAGATTCTCTGACTCCCACGCAGAAAAAGAATGCCAAGC  
GGAGGGAGAAGCAGAGAAGAAACAGTAAGAAGACCCAACCGGGAAGAATCCGAAA  
TGACCCAGCTGGACTCATATGCAAGCTCCGCGCCGCAAGGCAAGCTGAACCAAAGTA  
GTGACCCGACAATGTGCCACCAACATGACCCCTGAAA

## Muestra MPMA1. Segmento A

GGAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAGGA  
GCTCTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAACAAACAAACAATCTATATCAATG  
CAAGATGAACACAAACAAGGCAACCGCAACTTACCTGAAATCCATTATGCTTCCAGAG  
ACTGGACCAGCAAGCATCCCGGACGACATAACGGAGAGACACATCCTAAAACAAGAG  
ACCTCGTCATAACCTAGAGGTCTCCGAATCAGGAAGTGGCATTCTTGTTTGTTC  
CTGGGGCACCAGGCTCACGGATCGGTGCACACTACAGATGGAATGCGAACCAGACG  
GGGCTGGAGTTCGACCAGTGGCTGGAGACGTCGCAGGACCTGAAGAAAGCCTTCAA  
CTACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGACATCCAAAGCTCCACACTACCGGCCGG  
TCTCTATGCTCTGAACGGGACGCTCAACGCTGCCACCTTCGAAGGCAGCCTGTCTGA  
GGTGGAGAGCCTGACCTACAACAGCCTGATGTCCCTAACAAACGAACCCCCAGGACAA  
AGTCAACAACCAGCTGGTGACCAAAGGAGTACAGTCCTGAATCTACCAACAGGGTT  
CGACAAACCATACGTCCGCCTAGAGGACGAGACACCCCAGGGTCTCCAGTCAATGAA  
CGGGGCCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAACTGCACCGCGGAGGTACGAGATCGACC  
TCCCATCCCAACGCCTACCCCCGTTACTGCGACAGGAGCCCTCACCCTCTCTATG  
AGGGAAACGCTGACATCGTCAACTCCACGACAGTGGCGGGAGACATAAACTTCAGTC  
TGACAGACCAACCCGCAGTCGAGACCAAGTTCGACTTCCAGCTGGACTTCATGGGCC  
TTGACAACGACGTCCCAGTTGTCACAGTGGTCAGCTCCGTGCTGGCCACAAATGACA  
ACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGAGAACATCACAA  
AGCCGATCACCAGGGTCAAGCTGTCATAAAGCTCAACCAGCAGACAGCAATCGGCA  
ACGTGCCACCCTGGGCACAATGGGTCCAGCATCCGTCTCCTTCTCATCAGGGAACG  
GGAATGTCCCCGGCGTGCTCAGACCAATCACACTGGTGGCCTATGAGAAGATGACAC  
CGCTGTCCATACTGACCGTAGCTGGAGTGTCCAACACTACGAGCTGATCCCAAACCCAG  
AACTCCTAAAGAACATGGTAACACGCTATGGCAAGTACGACCCCGAAGGTCTCAACT  
ATGCCAAGATGATCCTGTCCCACAGGGAAGAGCTGGACATCAGGACAGTGTGGAAGA  
CAGAGGAGTACAAGGAGAGGACCAGAGTCTTCAACGAAATCACGGACTTCTCCAGTG  
ACCTGCCCACGTCAAAGGCATGGGGCTGGAGAGACATAGTCAGAGGAATTCGGAAA  
GTGCGAGCTCCTGTACTGTCCACGCTGTTTCCAATGGCAGCACCACTCATAGGAATG  
GCAGACCAATTCATTGGAGATCTACCAAGACCAACGCAGCAGGCGGAAGGTACCAC  
TCCATGGCCGCAGGAGGGCGCTACAAAGACGTGCTCGAGTCCTGGGCAAGCGGAG  
GGCCCGACGGAAAATTCTCCCGAGCCCTCAAGAACAGGCTGGAGTCCGCCAACTAC  
GAGGAAGTCGAGCTTCCACCCCCCTCAAAGGAGTCATCGTCCCTGTGGTGCACACA

GTCAAGAGTGCACCAGGCGAGGCATTTCGGGTCCCTGGCAATCATAATTCCAGGGGA  
GTACCCCGAGCTTCTAGATGCCAACCAGCAGGTCCTATCCCCTTCGCGAACGACAC  
CGGGAGCGTGTGGGGCATAGGAGAGGACATACCCTTCGAGGGAGACAACATGTGCT  
ACACTGCACTCCCCTCAAGGAGATCAAAGAAACGGGAACATAGTAGTCGAGAAGA  
TCTTCGCTGGACCAATCATGGGCCCTCTGCTCAACTAGGACTGTCCCTACTTGTGAA  
CGACATCGAGGACGGAGTTCCAAGGATGGTATTACCGGCGAAATCGCCGATGACG  
AGGAGACAATCATACCAATCTGCGGTGTAGACATCAAAGCCATCGCAGCCCATGAAC  
AAGGGCTGCCACTCATCGGCAACCAACCAGGAGTGGACGAGGAGGTGCAAAACACA  
TCCCTGGCCGCACACCTGATCCAGACCGGAACCCTGCCCGTACAACGCGCACAGGG  
CTCCAACAAGAGGATCAAGTACCTGGGAGAGCTGATGGCATCAAGTGCATCCGGGAT  
GGACGAGGAACTGCAACGCCTCCTGAACGCCACAATGGCACGGGCCAAAGAAGTCC  
AGGACGCCGAGATCTACAACTTCTCAAGCTCATGGCATGGACCAGAAAGAACGACC  
TCACCGACCACATGTACGAGTGGTCAAAGAGGACCCCAATGCACTAAAGTTCGGAA  
AGCTCATCAGCACGCCACCAAAGCACCCCTGAGAAGCCCAAAGGACCAGACCAACACA  
CCGCCCAAGAGGCGAGAGCCACCCGCATATCACTGGACGCCGTGAGAGCCGGGGC  
GGACTTCGCCACACCGGAATGGGTTCGCGCTGAACAACCTACCGCGGCCATCTCCCG  
GGCAGTTCAAGTACTACCTGATCACTGGACGAGAACCAGAACCAGGCGACGAGTACG  
AGGACTACATAAAACAATCCATTGTGAAACCGACCGACATGAACAAAATCAGACGTCT  
AGCCAACAGTGTGTACGGCCTCCCACACCAGGAACCAGCACCAGAGGAGTTCTACG  
ATGCAGTTGCAGCTGTATTCGCACAGAACGGAGGCAGAGGTCCCGACCAGGACCAA  
ATGCAAGACCTCAGGGAGCTCGCAAGACAGATGAAACGACGACCCCGGAACGCCGA  
TGCACCACGGAGAACCAGAGCGCCAGCGGAACCGGCACCGCCCGGACGCTCAAGG  
TTCACCCCCAGCGGAAATAACGCTGAGGTGTAACGACTACTCTCTTTCCTGACTGA

## Muestra MPMA1. Segmento B

CTGGAACAGTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATACCACGACTGTTTATGTATG  
CACGCGAGTGCCCCTTTCAAACCTCTACAATATACAACTTATGATATGTCGGACAT  
CTTCAATTCACCTCAGAACAAGGCTTCTATCTTGAATGCACTCATGAAGAGCACGCAG  
GGAGACGTGGAGGATGTTCTAATACCCAAGCGGTTTCAGACCCGCAAAGGATCCGTTA  
GATAGCCCCCAGGCTGCAGCCGCGTTCCTGAAAGAACAAGTATCGGATACTTAGG  
CCGCGAGCCATACCCACCATGGTTGAAATAGAGACGGATGCCGCTCTGCCTCGACTA  
GCGGCCATGGTGGACGATGGCAAGCTTAAGGAAATGGTCAATGTTCCCGAAGGAGC  
AACCGCGTTCTACCCAAAATACTACCCATTCCACAAACCCGACCATGACGACGTGGG  
AACGTTTGGGGCTCCAGACATAACACTACTCAAACAACCTGACGTTCTTCCTGCTGGAG  
AATGACTTTCCAACCTGGTCCAGAAACCCTAAGACAAGTCAGAGAAGCAATCGCAACC  
CTGCAATACGGGTCCGGCAGCTACTCAGGACAACCTAACAGGCTACTGGCAATGAAG  
GGCGTCGCCACGGGGAGGAATCCCAACAAGACTCCACTGGCCGTTGGCTACACCAA  
CGAGCAGATGGCAAGACTGATGGAGCAAACCTTGCCTATCAACCCTCCAAAGAATGA  
GGACCCAGACCTCCGATGGGCCCAAGCTGGTTGATACAGTACACCGGAGACGCAT  
CAACTGACAAGTCATATCTCCCTCATGTGACAGTCAAGTCATCTGCCGGCCTACCCTA  
CATAGGCAAACCAAAGGAGACACCACGGCTGAAGCCCTGGTGCTGGCAGACTCCTT  
CATAAGGGACCTCGGAAAAGCCGCAACCTCAGCCGACCCAGAGGCGGACGTCAAGA  
AAGTACTGTCCGACTTCTGGTACCTCAGCTGCGGTCTGCTCTTCCCAAAGGGGAGA  
GATACACACAGAAAGACTGGGACTTGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCCCCCTATC  
CAACGCACCTATTACTATCAATGGTGTGTCACCGGTGATGGATGAGTCAAACCTCAA  
CATCACCAACACTCAGACCCCTTCTCTGTATGGGTTCTCACCATTCCATGGTGGGATC  
AACAGAATCATGACCATCATCAGAGATCATCTAGATCAAGAGCAGGACCTAGTCATGA  
TATATGCCGACAACATATACTACTACAGGACAACACCTGGTACTCCATCGATCTAGA  
AAAGGGAGAAGCAAACCTGCACACCACAACACATGCAGGCAATGATGTACTACCTGCT  
CACACGCGGATGGACAAACGAGGACGGCTCACCACGGTACAACCCGACGTGGGCAA  
CATTGCCATGAACGTTGGGCCCTCAATGGTAGTGGACTCAACCTGCCTGCTGATGA  
ATCTGCAGCTGAAGACCTACGGGCAAGGCAGTGGGAATGCCTTACCTTCTCAACA  
ACCATCTCATGTCCACAATTGTGGTCGCAGAGTGGCACAAGGCAGGAAGGCCAAATC  
CCATGTCCAAAGAATTCATGGACCTCGAAGCAAAGACGGGGATCAACTTCAAATCG  
AGCGCGAGCTAAAAGACCTAAGGTGATCATCATGGAGGCGGTAGACACCCGCCCA  
CTCGACGGCTATCTAGCCGACGGGTCCGACCTGCCACCCAGGGTGCCAGGGAAGGC

GGTGGAGCTCGACCTTCTAGGATGGTCCGCAGTGTACAGCCGACAACCTCGAGATGTT  
CGTCCCCGTCTTGAAAACGAAAGACTAATTGCATCAGTCGCCTACCCAAAAGGGCT  
AGAGAACAAATCCCTAGCTCGAAAACCCGGGGCCGAGATCGCATAACCAATAGTAAG  
GTATGAAGCGATTTCGGCTCATCGGAGGCTGGAACAATCCACTCATCGAAACGGCAGC  
AAAACACATGTCCCTGGACAAAAGGAAGAGACTGGAGGTAAAAGGCATCGACGTCAC  
CGGATTCTAGACGACTGGAACACCATGTCCGGAGTTCGGAGGCGATCTGGAGGGCA  
TCTACTAACAGCTCCCCTCACAAACCAGACTCTCCTAGACATCAACACGCCAGAGAC  
CGAGTTCGACGTCAAAGACAGACCCCCACGCCGCGTTCCCAGGCCAAAACCCTCG  
CCGAGGTAACCGCAGCGATAACATCAGGGACCTACAAAGACCCCAAAAGTGCAGTGT  
GGAGGCTCCTCGACCAGAGGACCAAACACTACGCGTGAGCACCTACGCGATCAGGCG  
CACGCGCTAAAACCCGCAGCGTCAACATCCGACAACCTGGGGGGACGCCACAGAAGA  
ACTCGCCGAACAACAACAGCTGCTGATGAAGGCAAACAACCTGCTAAAGAGCAGCCT  
CACGGAAGCGAGGGGAAGCCCTCGAAACCGTGCAGTCAGACAAAATAATCTCAGGCAA  
AACCTCTCCAGAGAAGAATCCCGGGACCGCCGCAAACCCCGTGGTTGGCTATGGAG  
AATTCAGTGAGAAAATTCCTCTCACTCCCACGCAAAGAAGAACGCCAAGCGTCGGG  
AGAAGCAGAGAAGAACTAAGAACGAAGACCAGGGAGCATCCGAAATGAAATGGATG  
GACTCACAAGAGCTCCGCGCCAACAGGCAATCCAGACCAAAGTAGTGACCTGAGACA  
GTGCCACCAACATGACCCCTGAAAA

## Muestra PITR1C. Segmento A

GAAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAGGAGC  
TCTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAACAACCAACAATTCTATCTACATGAA  
TCATGAATACAACAAAGGCAACCGCAACTTACCTGAGATCCATCATGCTTCCCGAGAA  
TGGACCAGCAAGCATTCCGGATGACATAACAGAGAGACACATACTAAAACAAGAGAC  
CTCATCATACTTAGAGGTCTCCGACTCAGGAAGTGGGCTTCTTGTCTGCTTCCCT  
GGGGCTCCCGGATCCAGAGTCGGTGCCCACTATAGGTGGAATCTGAACCAGACGGA  
ACTGGAATTCGACCGGTGGTTGAAACATCACAGGACCTGAAGAAAGCATTAACTA  
CGGGAGGTTGATCTCACGGAAATACGACATCCAGAGCTCGACCCTTCCCGCTGGCCT  
CTATGCACTCAACGGGACCCTGAATGCAGCTACCTTCGAAGGAAGTCTTTCTGAGGT  
GGAGAGCCTGACCTATAACAGCTTGATGTCCCTGACAACAACCCCCAGGACAAGGT  
TAACAACCAACTAGTGACCAAAGGAATAACCGTCTGAACCTTCCAACCTGGGTTTGAC  
AAGCCATACGTCCGCCTTGAGGACGAGACACCGCAGGGCTCCCAGTCCATGAACGG  
AGCCAGGATGAGGTGCACCGCTGCAATCGCACCAAGGAGGTACGAAATAGACCTCC  
CATCTGAGCGCCTACCAACCGTGGCAGCAACTGGGACCCCAACAACAATCTATGAAG  
GGAACGCCGACATTGTGAACTCAACCACAGTGACAGGAGACGTAACCTTCCAACCTAG  
CAGCCGAACCCGCCAATGAGACGCGGTTGACTTCATCCTACAATTCTTGGGCTTG  
ACAATGATGTGCCCGTGGTCTCCGTGACAAGCTCAACCCTGGTCACGGCCGACAACCT  
ACAGGGGGCGCCTCCGCCAAGTTTACGCAGTCAATCCCAACGGAATAATAACTAAGC  
CCATTACAAGGGTCAGGCTGGCCTACCAGCTCAACCGGCAGACCGAAATTGGAAACG  
CCGCAACACTCGGGGCCAAAGGACCCGCGTCAGTCTCATTCTCATCAGGGAATGGC  
AATGTGCCGGGGGTTTTAAGACCCATAACCTTGGTGGCATAACGAGAAGATGACCCCC  
CAGTCAATTCTGACCGTGGCCGGCGTATCCAACCTATGAGCCGATCCCCAACCCAGAC  
CTCCTGAAGAACATGGTCACCAAGTATGGCAAATATGACCCTGAGGGCCTCAACTAT  
GCTAAGATGATCCTATCCCACAGGGAGGAGCTAGACATCAGAACTGTCTGGAGGACC  
GAGGAGTATAAGGAGAGGACAAGAGCCTTCAATGAGATCACTGACTTTACAAGTGAC  
CTGCCAACATCAAAAGCATGGGGGTGGAGAGACCTGGTCAGAGGCATCAGAAAAGT  
GGCAGCACCAAGTGTGTCAACGCTCTTCCCAATGGCCGCCCACTTATCGGCGCGG  
CCGACCAGTTCATCGGTGACCTACCAAGACCAACTCAGCCGGGGGGCGCTACCAG  
TCACATGCGGCTGGAGGCCGCTACCGCGACGTCATGGACACATGGGCTAGTGGCTC  
CGAGACAGGAAGCTACTCAAAGCACCTTAAGACCCGGCTTGAGTCCAACAACCTATGA  
GGAAGTGGAGCTTCCCAAGCCAACAAAAGGAGTCATCTTTCCTGTGGTGCACACCGT

AGAAAGTGCACCAGGTGAGGCCTTCGGGTCGCTCGTGGTTGTGATACCAGGAGCAT  
ACCCGGAACCTTCTTGACCCAAACCAACAGGTCCTATCCTACTTTAAGAACGACACAGG  
CTGTGTCTGGGGGATAGGAGAAGACATTCCATTTGAAGGAGATGACATGTGCTACAC  
CGCACTGCCCCTAAAGGAGATCAAGAGGAACGGCAACATCGTAGTGAGAAAATATT  
CGCTGGCCCTGCGATGGGACCGTCGGCCCAACTTGCGCTGTCCCTACTAGTCAACG  
ACATAGACGAGGGGATTCCAAGGATGGTCTTCACAGGGGAGATTGCTGATGACGAG  
GAAACAGTCATCCCGATCTGCGGAGTAGACATCAAAGCCATTGCCGCCCATGAACAT  
GGGCTGCCACTCATTGGCTGTCAACCAGGGGTCGACGAGATGGTGGCAAACACATC  
TCTCGCATCACACCTGATTCAGAGCGGCGCCCTACCAGTGCAGAAAGCACAGGGGG  
CCTGCAGGAGAATCAAGTACCTGGGCCAACTGATGAGAACAACCTGCATCAGGGATGG  
ACGAGGAACTGCAGGGGCTGCTGCAGGCCACCATGGCCAGAGCAAAGGAAGTCAAG  
GATGCCGAGGTGTTCAAACCTCCTGAAGCTGATGTCCTGGACGCGGAAGAACGACCTC  
ACAGACCACATGTACGAGTGGTCAAAGAGGACCCTGATGCAATCAAGTTTGGCAGG  
CTCATCAGCACCCCCCAAACATCAAGAGAAGCCAAAAGGACCCGACCAGCACACC  
GCCAGGAGGCAAAGCAACCAGAATATCACTGGACGCCGTCAAAGCCGGAGCAGA  
CTTTGCCTCACCCGAGTGGATTGCAGAGAACAACCTACCGCGGTCCAGCTCCAGGTCA  
GTTCAAGTACTACATGATAACGGGCAGAGTCCCAAACCCCGGAGAAGAGTACGAGGA  
CTACGTGCGAAAACCGATAACCCGACCAACCGACATGGACAAGATCAGACGCCTAGC  
CAACAGTGTTTACGGACTACCCACCAAGAGCCCGCACCCGGACGACTTCTACCAAGC  
AGTCGTCGAGGTGTTCCGCCGAGAATGGGGGGAGAGGACCTGACCAAGATCAAATGC  
AAGACCTGAGGGACTTGGCAAGGCAGATGAAACGACGACCCAGACCAGCTGATGCA  
CGCAGGCAAACCAGGACTCCACCGAGGGCGGCAACCTCCGGTGGTTCACGGTTTAC  
CCCCTCCGGCGATGACGGAGAAGTGTAACGACTACTCTCTTTCCTGACTGAT

## Muestra PITR1C. Segmento B

GAAACAGTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATACCACGACTGTTTATGTATGCAC  
GCAAGTGCCCCTTAATAAATTTCTATACACACAACACTCATGATATGTCCGGACATCTTCAA  
CTCACCACAGAACAAGGCTTCTATCTTGAGCGCTCTAATGAGGAGCACAGCAGGAGA  
TGTAGAGGATGTGCTAATACCAAACGCTTCAGGCCCGCCAAGGACCCCCTTGACAG  
CCCTCAGGCAGCAGCACAGTTCCTGAAGGACAACAAGTATCGGATACTTAGGCCGCG  
AGCCATTCCGACCATGGTTCGAACTAGAGACAGATGCCGCTCTGCCCCGACTGCGACA  
AATGGTGGACGATGGCAAGCTTAAGGACACGGTAAGCGTCCCAGAAGGAACCACTG  
CATTCTACCCCAAATACTATCCATTCCACAAGCCAGACCACGATGAGGTGGGGACGT  
TCGGGGCTCCGGACATCACGCTTCTGAAGCAACTTACCTTCTTCTGTTGGAGAACG  
ACTTCCCACAGGACCAGATACACTCAGGCAGGTACGTGAGGCCATAGCTACACTCC  
AGTATGGATCAGGTAGCTACTCCGGACAGCTAAACAGGCTCCTGGCCATGAAGGGAG  
TTGCCACCGGCAGGAATCCAAACAAGACTCCAAAAACAGTAGGCTACACAAACGAGC  
AGCTAGCAAAACTGCTGGAGCAGACACTACCGATCAACACCCCCAAAACATGAGGACC  
CCGACCTCCGGTGGGCCCCAGCTGGTTGATCAACTACACCGGAGACCTGAGCACG  
GACAAGTCATACCTGCCACACGTGACTATAAAGTCCTCAGCCGGCCTACCCTACATA  
GGCAAACCAAAGGAGACACGACTGCAGAGGCGCTCGTACTGGCCGACTCCTTCATA  
CGTGACCTCGGAAAAGCAGCCACATCAGCCGATCCAGAAGCGGGAGTGAAGAAAAC  
CATCACTGACTTCTGGTACCTGAGCTGTGGGCTGCTCTTCCCGAAGGGCGAGAGATA  
CACACAGATTGACTGGGACAAGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCGCCCTACCCAAC  
ACACCTACTACTATCAATGGTGTTCATCCCCAGTAATGGACGAGTCAAACTCAACATT  
ACCAACACCCAGACACCATCCCTGTATGGGTTCTCCCCATTCCACGGAGGGATGGAC  
AGAATCATGACCATTATCAGAGACAGTCTGGACAACAACGAGGACCTAGTGATGATCT  
ATGCAGACAACATTTACATAACAGCAGGACAACACGTGGTACTCAATAGACCTAGAAAA  
GGGCGAGGCCAACTGCACTCCACAACACATGCAGGCCATGATGTACTACCTCCTGAC  
CAGGGGGTGGACGAACGAGGATGGCTCTCCGCGGTACAATCCGACATGGGCAACAT  
TCGCCATGAATGTGGCCCCGTCGATGGTCGTGGACTCCTCCTGTCTTCTGATGAACC  
TTCAGCTGAAGACCTACGGCCAGGGCAGTGGGAACGCCTTTACCTTCTAAATAACC  
ACCTCATGTCAACGATCGTCGTGGCCGAGTGGGTAAAAGCCGGGAAGCCAAACCCC  
ATGACAAAAGAGTTCATGGACCTCGAGGAGAAGACGGGGATCAACTTTAAGATAGAG  
CGCGAGCTAAAGAACTTGAGAGAAACCATCATCGAGGCCGTGGAGACGGCCCCCA  
GGATGGCTACCTCGCCGATGGATCCGATCTACCCCCGAACAGACCAGGGAAAGCCG

TCGAGCTAGACCTTCTTGGCTGGTCAGCCATCTACAGCCGCCAAATGGAGATGTTCCG  
TCCAATCCTCGAGAACGAGCGACTAATTGCCTCAGCGGCCTACCCAAGGGACTTG  
AGAACAAGACCTTGGCCCGGAAACCCGGGGCCGAGATTGCGTACCAGATAGTGCGG  
TATGAAGCAATCAGGCTGGTGGGCGGCTGGAACAATCCACTGCTAGAAACCGCAGC  
CAAACACATGTCCCTTGACAAGAGAAAGAGACTGGAGGTGAAGGGGCTGGACGTCA  
CCGGGTTCTTAGATGCCTGGAACGACATGTCAGAATTCGGCGGAGACCTGGAAGGC  
ATAACGCTGTCTGAGCCCCTCACAAACCAAACCTCTGATTGACATCAACACACCCCTGG  
AGAGCTTCGACCCCAAAGCCAGGCCACAAACACCACGGTCACCAAAGAAAACCCTGG  
ACGAGGTGACGGCCGCCATCACATCAGGGACCTACAAGGACCCCAAGAGTGCAAGTG  
TGGCGACTGCTAGACCAAAGGACCAAACCTTCGGGTCAGCACACTGCGAGACCAAGC  
GTCAGCACTGAAACCAGCCTCGTCCTCGGTGACAACCTGGGCCGAAGCCACAGAGG  
AGCTAGCGGAGCAACAACAACCTTCTCATGAAGGCCAACCAACCTGCTAAAGAGCAGCT  
TGACGGAAACAAGAGAGGCACTAGAGACCATCCAGTCTGACAAAATCATCGCCGGGA  
AGTCCAACCCTGAAAAGAACCAGGGACCGCAGCCAACCCAGTGGTTGGCTACGGG  
GAATTCAGCGAGAAGATTCTCTGACTCCCACGCAGAAAAAGAATGCCAAGCGGAGG  
GAGAAGCAGAGAAGAAACCAGTAAGAAGACCAAACCGGGAAGAATCCGAAATGACC  
CAGCTGGACTCATATGCAAGCTCCGCGCCAAAAGGCAAGCTGAACCAAAGTAGTGAC  
CCGACAATGTGCCACCAACATGACCCCTGAA

## Muestra RV04. Segmento A

AAAGAGAGTTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTCTTACGGAGGAGCT  
CTCCGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAACAAACAAACAATCTATATCAATGCAA  
GATGAACACAAACAAGGCAACCGCAACTTACCTGAAATCCATTATGCTTCCAGAGACT  
GGACCAGCAAGCATCCCGGACGACATAACGGAGAGACACATCTTAAAACAAGAGACC  
TCGTCATACAACTTAGAGGTCTCCGAATCAGGAAGTGGCATTCTTGTTTGTTCCTG  
GGGACCAGGCTCACGGATCGGTGCACACTACAGATGGAATGCGAACCAGACGGGG  
CTGGAGTTCGACCAGTGGCTGGAGACGTTCGCAGGACCTGAAGAAAGCCTTCAACTAC  
GGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGACATCCAAAGCTCCACACTACCGGCCGGTCTC  
TATGCTCTGAACGGGACGCTCAACGCTGCCACCTTCGAAGGCAGTCTGTCTGAGGTG  
GAGAGCCTGACCTACAACAGCCTGATGTCCCTAACAAACGAACCCCCAGGACAAAGTC  
AACACCAGCTGGTGACCAAAGGAGTCACAGTCCTGAATCTACCAACAGGGTTCGAC  
AAACCATACGTCCGCCTAGAGGACGAGACACCCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGG  
GGCCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCGCGGAGGTACGAGATCGACCTCC  
CATCCCAACGCCTACCCCCGTTACTGCGACAGGAACCCTCACCACCCTCTACGAGG  
GAAACGCCGACATCGTCAACTCCACGACGGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGA  
CAGAACAACCCGCAGTCGAGACCAAGTTCGACTTCCAGCTGGACTTCATGGGCCTTG  
ACAACGACGTCCCAGTTGTCACAGTGGTCAGCTCCGTGCTGGCCACAAATGACAACT  
ACAGAGGAGTCTCAGCCAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGAGAACATCACAAAGC  
CGATCACCAGGGTCAAGCTGTCATAAAGATCAACCAGCAGACAGCAATCGGCAACG  
TCGCCACCCTGGGCACAATGGGTCCAGCATCCGTCTCCTTCTCATCAGGGAACGGGA  
ATGTCCCCGGCGTGCTCAGACCAATCACACTGGTGGCCTATGAGAAGATGACACCGC  
TGTCATCCTGACCGTAGCTGGAGTGTCCAACACTACGAGCTGATCCCAAACCCAGAAC  
TCCTAAAGAACATGGTAACACGCTATGGCAAGTACGACCCCGAGGGTCTCAACTATG  
CCAAGATGATCCTGTCCCACAGGGAAGAGCTGGACATCAGGACAGTGTGGAGGACA  
GAGGAGTACAAGGAGAGGACCAGAGTCTTCAACGAAATCACGGACTTCTCCAGTGAC  
CTGCCACGTCAAAGGCATGGGGCTGGAGAGACATAGTCAGAGGAATTCGGAAAGT  
CGCAGCTCCTGTACTGTCCACGCTGTTTCCAATGGCAGCACCACTCATAGGAATGGC  
AGACCAATTCATTGGAGATCTCACCAAGACCAACGCAGCAGGCGGAAGGTACCACTC  
CATGGCCGCAGGAGGGCGCCACAAAGACGTGCTCGAGTCCTGGGCAAGCGGAGGG  
CCCGACGGAAAATTTTCCCGAGCCCTCAAGAACAGGCTGGAGTCCGCCAACTACGAG  
GAAGTCGAGCTTCCACCCCCCTCAAAGGAGTCATCGTCCCTGTGGTGCACACAGTC

AAGAGTGCACCAGGCGAGGCATTTCGGGTCCCTGGCAATCATAATTCCAGGGGAGTA  
CCCCGAGCTTCTAGATGCCAACCAGCAGGTCCCTATCCCCTTCGCAAACGACACCGG  
GAGCGTGTGGGGCATAGGAGAGGACATACCCTTCGAGGGAGACAACATGTGCTACA  
CTGCACTCCCCTCAAGGAGATCAAAGAAACGGGAACATAGTAGTCGAGAAGATCT  
TTGCTGGACCAATCATGGGTCCCTCTGCTCAACTAGGACTGTCCCTACTTGTGAACGA  
CATCGAGGACGGAGTTCCAAGGATGGTATTCACCGGCGAAATCGCCGATGACGAGG  
AGACAATCATACCAATCTGCGGTGTAGACATCAAAGCCATCGCAGCCCATGAACAAG  
GGCTGCCACTCATCGGCAACCAACCAGGAGTGGACGAGGAGGTGCGAAACACATCC  
CTGGCCGCACACCTGATCCAGACCGGAACCCTGCCCGTACAACGCGCAAAGGGCTC  
CAACAAGAGGATCAAGTACCTGGGAGAGCTGATGGCATCAAATGCATCCGGGATGGA  
CGAGGAACTGCAACGCCTCCTGAACGCCACAATGGCACGGGCCAAAGAAGTCCAGG  
ACGCCGAGATCTACAACTTCTCAAGCTCATGGCATGGACCAGAAAGAACGACCTCA  
CCGACCACATGTACGAGTGGTCAAAGAGGACCCCAATGCACTAAAGTTCGGAAAGC  
TCATCAGCACGCCACCAAAGCACCCCGAGAAGCCCAAAGGACCAGACCAACACCAC  
GCCCAAGAGGCGAGAGCCACCCGCATATCACTGGACGCCGTGAGAGCCGGGGCGG  
ACTTCGCCACACCGGAATGGGTTCGCGCTGAACAACCTACCGCGGCCCATCTCCCGG  
CAGTTCAAGTACTACCTGATCACTGGACGAGAACCAGAACCAGGCGACGAGTACGAG  
GACTACATAAAACAACCCATTGTGAAACCGACCGACATGAACAAAATCAGACGTCTAG  
CCAACAGTGTGTACGGCCTCCCACACCAGGAACCAGCACCAGAGGAGTTCTACGATG  
CAGTTGCAGCTGTATTTCGCACAGAACGGAGGCAGAGGTCCCGACCAGGACCAAATG  
CAAGACCTCAGGGAGCTCGCAAGACAGATGAAACGACGACCCCGGAACGCCGATGC  
ACCACGGAGAACCAGAGCGCCAGCGGAACCGGCACCGCCCGGACGCTCAAGGTTC  
ACCCCAGCGGAGATAACGCTGAGGTGTAACGACTACTCTCTTTCCTGACTGA

## Muestra RV04. Segmento B

GGAAACAGTGGGTCAACGTTGGTGGCACCCGACATACCACGACTGTTTATGTATGCA  
CGCGAGTGCCCCTTTTAAACCTCTACAATATACAACTTATGATATGTCCGACATCTTC  
AATTCACCTCAGAACAAGGCTTCTATCTTGAATGCACTCATGAAGAGCACGCAGGGA  
GACGTGGAGGATGTTCTAATACCCAAGCGTTTCAGACCCGCAAAGGATCCGTTAGAT  
AGCCCCAGGCTGCAGCCGCGTTCCTGAAAGAACAAGTATCGGATACTTAGGCCG  
CGAGCCATACCCACCATGGTTGAAATAGAGACGGATGCCGCTCTGCCTCGACTAGCG  
GCCATGGTGGATGATGGCAAGCTTAAGGAAATGGTCAATGTTCCCGAAGGAACAACC  
GCGTTCTACCCAAAATACTACCCATTCCACAAACCCGACCATGACGACGTGGGAACG  
TTTGGGGCTCCAGACATAAACTACTCAAACAACCTGACGTTCTTCTGCTGGAGAATG  
ACTTTCCAACCTGGTCCAGAAACCCTAAGACAAGTCAGAGAAGCAATCGCAACCCTGC  
AATACGGGTCCGGCAGCTACTCAGGACAACCTCAACAGGCTACTGGCAATGAAGGGC  
GTCCGACGGGGAGGAATCCCAACAAGACTCCACTGGCCGTTGGCTACACCAACGA  
GCAGATGGCAAGACTGATGGAGCAAACCTTGCCTATCAACCCTCCAAAGAATGAGGA  
CCCAGACCTCCGATGGGCCCAAGCTGGTTGATACAGTACACCGGAGACGCATCAA  
CTGACAAGTCATATCTCCCTCATGTGACAGTCAAGTCATCTGCCGGCCTACCCTACAT  
AGGCAAACCAAAGGAGACACCACGGCTGAAGCCCTGGTGCTGGCAGACTCCTTCAT  
AAGGGACCTCGGAAAAGCCGCAACATCAGCCGACCCAGAGGCGGACGTCAAGAAAG  
TACTGTCCGACTTCTGGTACCTCAGCTGCGGTCTGCTCTTCCCAAAGGGGAGAGAT  
ACACACAGAAAGACTGGGACTTGAAGACCAGGAACATCTGGAGTGCCCCCTATCCAA  
CGCACCTACTACTATCAATGGTGTGTCGTCACCGGTGATGGATGAGTCAAACTCAACAT  
CACCAACACTCAGACCCCTTCTCTGTACGGGTTCTCACCATTCCACGGTGGGATCAA  
CAGAATCATGACCATCATCAGAGAGCATCTAGATCAAGAGCAGGACCTAGTCATGATA  
TATGCAGACAACATATACTACTACAGGACAACACCTGGTACTCCATCGATCTAGAAA  
AGGGAGAAGCAAACCTGCACACCACAACACATGCAGGCAATGATGTACTACCTGCTCA  
CACGCGGATGGACAAACGAGGACGGCTCACACGGTACAACCCGACGTGGGCAACA  
TTCGCCATGAACGTTGGGCCCTCAATGGTAGTGGACTCAACCTGCCTGCTGATGAAT  
CTGCAGCTGAAGACCTACGGGCAAGGCAGTGGGAATGCCTTCACCTTCTCAACAAC  
CATCTCATGTCCACAATTGTGGTTCGCGGAGTGGCACAAGGCAGGAAGGCCAAATCCC  
ATGTCAAAGAATTCATGGACCTCGAAGCAAAGACGGGGATCAACTTCAAATCGAG  
CGCGAGCTAAAAGACCTAAGGTGCATCATGGAGGCGGTAGACACCGCCCCACT  
CGACGGCTATCTAGCCGACGGGTCCGACCTGCCACCCAGGGTGCCAGGGAAGGCG

GTGGAGCTCGACCTTCTAGGATGGTCCGCAGTGTACAGCCGACAACCTCGAGATGTTC  
GTCCCCGTCTTGTAAAACGAAAGACTAATTGCATCAGTCGCCTACCCAAAAGGGTTA  
GAGAACAAATCCCTAGCTCGAAAACCCGGGGCCGAGATCGCATACCAAATAGTAAGG  
TATGAAGCGATTTCGGCTCATCGGAGGCTGGAACAATCCACTCATCGAAACGGCAGCA  
AAACACATGTCCCTGGACAAAAGGAAGAGACTGGAGGTAAAAGGCATCGACGTCACC  
GGATTCCTAGACGACTGGAACACCATGTCTGGAGTTCGGAGGCGATCTGGAGGGCAT  
CTCACTAACAGCTCCCCTCACAAACCAGACTCTCCTAGACATCAACACGCCAGAGAC  
CGAGTTCGACGTCAAAGACAGACCCCCACGCCGCGTTCCCCAGGCCAAAACCCTCG  
CCGAGGTAACCGCAGCGATAACATCAGGGACCTACAAAGACCCCAAAAGTGCAGTGT  
GGAGGCTCCTCGACCAGAGAACCAAACTACGCGTGAGCACCTACGCGATCAGGCG  
CACGCGCTAAAACCCGCAGCGTCAACATCCGACAACCTGGGGGGACGCCACAGAAGA  
ACTCGCCGAACAACAACAGCTGCTGATGAAGGCAAACAACCTGCTAAAGAGCAGCCT  
CACGGAAGCGAGGGGAAGCCCTCGAAACCGTGCAGTCAGACAAAATAATCTCAGGCAA  
AACCTCTCCAGAGAAGAATCCCGGGACCGCCGCAAACCCCGTGGTTGGCTATGGAG  
AATTCAGCGAGAAAATTCTCTCACTCCCACGCAAAGAAGAACGCCAAGCGTCGGG  
AGAAGCAGAGAAGAACTAAGAACGAAGACCAGGGAGCATCCGAAATGAAATGGATG  
GACTCACAAGAGCTCCGCGCCAGAAGGCAATCCAGACCAAAGTAGTGACCTGAGACA  
GTGCCACCAACATGACCCCTGAAA